

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین

دانشکده پزشکی شهید بابایی

پایان نامه جهت دریافت کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی

عنوان پایان نامه

بررسی اثر پروتواسکولیسیدال گیاهان دارویی و تعیین اثر ایمونومدولاتوری گیاهان
پروتواسکولیسید بر روی سلولهای عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای

اساتید راهنما

دکتر مجتبی شهنازی - دکتر عباس آزاد مهر

اساتید مشاور

دکتر رضا حاجی آقایی

دکتر محمود علیپور

نگارش

سحر مطّی

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه اِثار و از خودگذشتگی،
به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین
روزگار از بهترین پشتیبان من است،
به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس من است و سرگردانی و ترس در
پناهشان به شجاعت می گراید،
و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند،
این مجموعه را به خانواده عزیزم تقدیم می کنم.

با سپاس فراوان از اساتید گرامیم جناب آقای دکتر مجتبی شهنازی و جناب آقای دکتر عباس آزادمهر که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند. باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

از زحمات اساتید مشاور محترم جناب آقای دکتر رضا حاجی آقایی و جناب آقای دکتر محمود علیپور بسیار سپاسگزارم چرا که بدون راهنماییهای ایشان تامین این پایان نامه بسیار مشکل مینمود.

همچنین از استاد ارجمند جناب آقای دکتر مهرزاد سرائی بابت راهنمایی های بزرگوارانه ، بدون چشمداشت و آنچه به ما آموختند دادند سپاسگزارم. از سرکار خانم صادقی و جناب آقای باقری پرسنل آزمایشگاه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و پرسنل محترم مرکز تحقیقات علوم پایه به دلیل یاری های بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختیها را برایم آسانتر نمودند، سپاسگزارم.

چکیده

زمینه و هدف: هیداتیدوز یا اکینوکوکوزیس یکی از مهمترین بیماری های زئونوز بوده و از معضلات مهم بهداشتی به شمار می رود. موثرترین روش درمان این بیماری عمل جراحی است. یافتن ماده ای پروتواسکولیسید بدون اثر جانبی و در عین حال موثر، کمک زیادی در جراحی کیست داشته و از انتشار عفونت جلوگیری می کند. مواد پروتواسکولیسید زیادی مورد استفاده قرار گرفته ولی تا به حال مورد رضایت کامل واقع نشده است. در حال حاضر استفاده از گیاهان دارویی به عنوان یک ماده اسکولیسیدال و جایگزین مواد شیمیایی و مصنوعی دیگر که بتواند برای بدن بی ضرر بوده و باعث تقویت سیستم ایمنی بدن شود مورد توجه قرار گرفته است.

هدف: ارزیابی اثر پروتواسکولیسیدال چند گیاه دارویی و تعیین اثر ایمنومدولاتوری گیاهان موثر بر پروتواسکولکس ها بر روی سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای.

مواد و روشها: کبد گوسفندان آلوده به کیست هیداتید، از کشتارگاه قزوین تهیه و با رعایت شرایط استریل، پروتواسکولکس ها جدا گردید. عصاره یا اسانس گیاهان سرخارگل، برگ گردو، آزاددرخت، افسنتین، بومادران، رازیانه و اکالیپتوس با غلظتهای ۳، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml، در مدت زمانهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه با پروتواسکولکس ها مواجه گردید. کلرور سدیم ۰/۹٪ به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و ویابیلیتی پروتواسکولکس ها با استفاده از آنوزین ۰/۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر ایمنومدولاتوری اسانس وعصاره گیاهان پروتواسکولیسیدال، بر روی بیان مارکر های بلوغ سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای بررسی شد. سلول های عرضه کننده

آنتی ژن حرفه ای جدا شده از طحال موش با روش بید مغناطیسی MACS، به تعداد ۱۰۰/۰۰۰ سلول در هر چاهک ریخته شده و با غلظتهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ عصاره یا اسانس گیاهان به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C کشت داده شدند و بیان مارکرهای بلوغ CD40، CD86 و MHCII با روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج مطالعه نشان داد که گیاه اکالیپتوس در غلظت ۱۰ mg/ml در مدت ۱۰ دقیقه، ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها را کشت. در حالیکه گیاهان دارویی رازیانه و افسنتین به ترتیب در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml توانستند در همان مدت زمان (۱۰ دقیقه)، ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها را بکشند. علاوه بر آن، گیاهان دارویی بومادران و سرخارگل در غلظت ۵ mg/ml در مدت زمان ۴۰ دقیقه تمامی پروتواسکولکس ها را از بین بردند.

دیگر نتایج تحقیق نشان داد که عصاره گردو در غلظت ۱۰۰ mg/ml بعد از ۶۰ دقیقه سبب تخریب ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها شد، در حالیکه آزاددرخت در تمام غلظتهای مورد استفاده و مدت زمانهای مواجهه، اثر قابل ملاحظه ای بر روی پروتواسکولکس ها نداشت. در بررسی اثر ایمنومدولاتوری اسانس و عصاره گیاهان فوق بر مارکرهای بلوغ سلولهای عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای (MHCII، CD86 و CD4) مشخص شد، عصاره اتانولی افسنتین و رازیانه در غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ سبب افزایش معنی دار مارکر CD40 شدند و عصاره سرخارگل نیز در تمامی غلظتها سبب افزایش معنی دار هر سه مارکر شد ($P<0.05$). اسانس بومادران در غلظتهای ۱۰ و ۵۰ $\mu\text{g/ml}$ بر مارکر CD86 اثر افزایشی و در غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ روی این مارکر اثر کاهشی داشت. همچنین غلظتهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ اسانس مذکور روی مارکر MHCII اثر کاهشی نشان دادند. غلظت

۱۰ $\mu\text{g/ml}$ باعث کاهش CD40 و غلظتهای بالاتر باعث افزایش آن شدند، این اثر در هیچ یک از غلظتها معنی دار نبود ($P>0.05$). علاوه بر آن، اسانس اکالیپتوس روی سه مارکر مورد بررسی در غلظت پایین تر (۱۰ $\mu\text{g/ml}$) بر مارکرهای CD86 و CD40 و MHCII اثر کاهشی و در غلظتهای بالاتر روی مارکرهای MHCII اثر کاهشی و بر CD86 و CD40 اثر افزایشی داشت اما این اثر معنی دار نبود ($P>0.05$).

نتیجه گیری: تمامی عصاره ها و اسانس های گیاهان بررسی شده به جز آزاددرخت و برگ گردو دارای اثر پروتواسکولیسیدال قابل ملاحظه ای بودند که این تاثیر در اسانس گیاهان اکالیپتوس، رازیانه، بومادران و عصاره گیاهان سرخارگل و افسنطین فوق العاده بود. در بررسی اثرات ایمنومدولاتوری گیاهان مذکور، رازیانه، افسنطین و سرخارگل دارای اثر ایمنومدولاتوری معنی داری بودند. با این حال تحقیقات بیشتر جهت شناسایی مواد موثر پروتواسکولیسید عصاره و اسانس گیاهان مذکور و اثر آنها بر بالانس پاسخ های ایمنی Th1/Th2 ضروری می باشد.

کلمات کلیدی: کیست هیداتیک، سلول های عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن، گیاهان دارویی،

ایمنومدولاتوری

فهرست مطالب

فصل اول

۱	مقدمه.....
۱	طبقه بندی انگل اکینوкокوس.....
۲	مورفولوژی اکینوкокوس گرانولوزوس.....
۳	مشخصات فرم لاروی یا متاستود (کیست هیداتیک).....
۴	چرخه تکاملی اکینوкокوس گرانولوزوس.....
۶	اپیدمیولوژی هیداتیدوز در جهان.....
۷	انتشار هیداتیدوز در ایران.....
۸	علائم بیماری و روش های تشخیص.....
۱۰	درمان.....
۱۰	روش جراحی.....
۱۲	درمان دارویی.....
۱۲	پاسخهای ایمنی میزبان در برابر کرمهای انگلی.....
۱۳	ایمنی بر علیه کیست هیداتیک.....
۱۳	پاسخ آنتی بادی.....
۱۳	پاسخ ایمنی سلولی و Th2.....

ارتباط سایتوکاین ها با تولید آنتی بادی.....۱۴

سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای (سلول های دندریتیک).....۱۵

بیان مسئله.....۲۰

فصل دوم

مروری بر متون.....۲۲

آزاد درخت (*Melia azedarach*).....۲۲

گردو (*Juglans regia*).....۲۶

افسنطین (*Artemisia absintium*).....۲۹

رازیانه (*Foeniculum vulgare*).....۳۵

بومادران (*Achillea millefolium*).....۳۹

اکالیپتوس (*Eucalyptus globoulus*).....۴۳

سرخارگل (*Echinacea purpurea*).....۴۷

فصل سوم

اهداف و فرضیات.....۵۳

هدف اصلی طرح.....۵۳

اهداف فرعی.....۵۳

اهداف کاربردی.....۵۴

فرضیه ها..... ۵۵

نوع مطالعه..... ۵۶

فصل چهارم

مواد و روش ها..... ۵۷

بررسی اثر عصاره و اسانس گیاهان دارویی بر روی پروتواسکولکس ها..... ۵۷

جمع آوری کیست های هیداتید و پروتواسکولکسها..... ۵۸

جمع آوری، شناسایی و تهیه اسانس گیاهان دارویی..... ۵۹

بررسی اثر پروتواسکولکسیدال اسانس یا عصاره گیاهان ۶۰

جداسازی، تخلیص و کشت سلولی سلول های دندریتیک (DCs) با روش بید مغناطیسی یا

Magnetic Cell Sorting(MACS)..... ۶۲

تهیه بافر هضم کننده..... ۶۴

جدا سازی سلولهای عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای از طحال موش..... ۶۵

تهیه محیط گرادیان ایزوتونیک نایکودنز..... ۶۶

جداسازی سلول های کم چگال توسط نایکودنز..... ۶۷

جداسازی و تخلیص $CD11c^{+}$ DCs با روش بید مغناطیسی (MACS)..... ۶۷

ارزیابی بلوغ $CD11c^{+}$ DCs با روش فلوسیتومتری..... ۶۹

فصل پنجم

یافته ها..... ۷۲

نتایج اثرات ایمونومدولاتوری گیاهان دارویی بر مارکرهای بلوغ سلول دندریتیک..... ۹۷

نتایج فلوسیتومتری مارکرهای بلوغ سلول $CD811c^+$ DCs بعد از کشت با عصاره یا اسانس

گیاهان..... ۹۸

فصل ششم

بحث ۱۰۴

نتیجه گیری..... ۱۲۲

پیشنهادهات..... ۱۲۳

فصل هفتم

فهرست منابع..... ۱۲۴

فهرست جداول

- جدول شماره ۱: جدول متغیرها..... ۵۶
- جدول شماره ۲: جدول لیست آنتی بادی های منوکلونال جهت فلوسایتومتری..... ۷۱
- جدول شماره ۳: اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف عصاره گیاه آزاد درخت در مدت زمانهای مختلف مواجهه..... ۷۵
- جدول شماره ۴: اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف عصاره برگ گردو در مدت زمانهای مختلف مواجهه..... ۷۶
- جدول شماره ۵: اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف عصاره گیاه افسنطین در مدت زمانهای مختلف مواجهه..... ۷۷
- جدول شماره ۶: اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف اسانس گیاه رازیانه در مدت زمانهای مختلف مواجهه..... ۷۸
- جدول شماره ۷ : اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف اسانس گیاه بومادران در مدت زمانهای مختلف مواجهه..... ۷۹
- جدول شماره ۸: اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف اسانس گیاه اکالیپتوس در مدت زمانهای مختلف مواجهه..... ۸۰

جدول شماره ۹: اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف عصاره گیاه سرخارگل در مدت زمانهای

مختلف مواجهه..... ۸۱

جدول شماره ۱۰: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml اسانس اکالیپتوس روی پروتواسکولکس

ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۸۲

جدول شماره ۱۱: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml اسانس اکالیپتوس روی پروتواسکولکس

ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۸۲

جدول شماره ۱۲: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml اسانس رازیانه روی پروتواسکولکس ها

در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۸۳

جدول شماره ۱۳: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml اسانس رازیانه روی پروتواسکولکس ها

در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۸۳

جدول شماره ۱۴: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰ mg/ml اسانس رازیانه روی پروتواسکولکس ها

در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۸۴

جدول شماره ۱۵: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۲۵ mg/ml اسانس رازیانه روی پروتواسکولکس ها

در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۸۴

جدول شماره ۱۶: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml اسانس بومادران روی پروتواسکولکس ها

در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۸۵

جدول شماره ۱۷: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml اسانس بومادران روی پروتواسکولکس ها

در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۸۵

جدول شماره ۱۸: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰ mg/ml اسانس بومادران روی پروتواسکولکس

ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۸۶

جدول شماره ۱۹: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml عصاره گردو روی پروتواسکولکس ها در

مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۸۶

جدول شماره ۲۰: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml عصاره گردو روی پروتواسکولکس ها در

مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۸۷

جدول شماره ۲۱: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰ mg/ml عصاره گردو روی پروتواسکولکس ها

در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۸۷

جدول شماره ۲۲: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۲۵ mg/ml عصاره گردو روی پروتواسکولکس ها

در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۸۸

جدول شماره ۲۳: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵۰ mg/ml عصاره گردو روی پروتواسکولکس ها

در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۸۸

جدول شماره ۲۴: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره گردو روی پروتواسکولکس ها

در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۸۹

جدول شماره ۲۵: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml عصاره سرخارگل روی پروتواسکولکس

ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۸۹

جدول شماره ۲۶: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml عصاره سرخارگل روی پروتواسکولکس

ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۹۰

جدول شماره ۲۷: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml عصاره افسنطین روی پروتواسکولکس ها

در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۹۰

جدول شماره ۲۸: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml عصاره افسنطین روی پروتواسکولکس ها

در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۹۱

جدول شماره ۲۹: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰ mg/ml عصاره افسنطین روی پروتواسکولکس

ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۹۱

جدول شماره ۳۰: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰ mg/ml عصاره افسنطین روی پروتواسکولکس

ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۹۲

جدول شماره ۳۱: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵۰ mg/ml عصاره افسنطین روی پروتواسکولکس

ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۹۲

جدول شماره ۳۲: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره افسنطین روی پروتواسکولکس

ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey ۹۳

جدول شماره ۳۳ : جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml عصاره آزاد درخت روی پروتواسکولکس

ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۹۳

جدول شماره ۳۴: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml عصاره آزاد درخت روی پروتواسکولکس

ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۹۴

جدول شماره ۳۵: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰ mg/ml عصاره آزاد درخت روی

پروتواسکولکس ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۹۴

جدول شماره ۳۶: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۲۵ mg/ml عصاره آزاد درخت روی

پروتواسکولکس ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۹۵

جدول شماره ۳۷: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵۰ mg/ml عصاره آزاد درخت روی

پروتواسکولکس ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۹۵

جدول شماره ۳۸: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره آزاد درخت روی

پروتواسکولکس ها در مدت زمان های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey..... ۹۶

فهرست تصاویر

- تصویر شماره (۱): ساختمان تخم اکینوкокوس گرانولوزوس..... ۳
- تصویر شماره (۲): ساختمان کیست هیداتیک..... ۴
- تصویر شماره (۳): چرخه تکاملی انگل اکینوкокوس گرانولوزوس..... ۵
- تصویر شماره (۴): عوامل موثر بر بلوغ سلول های دندریتیک..... ۱۹
- تصویر شماره (۵): پروتواسکولکسهای زنده پیش از مواجهه با عصاره یا اسانس گیاهان دارویی..... ۶۱
- تصویر شماره (۶): پروتواسکولکسهای مرده پس از مواجهه با عصاره یا اسانس گیاهان دارویی.... ۶۱
- تصویر شماره (۷): فلوسیتومتری درصد خلوص سلول $CD811c^{+} DCs$ ۹۷
- تصویر شماره (۸): نمونه ای نتایج فلوسایتومتری بروز مارکرهای بلوغ..... ۹۸
- تصویر شماره (۹): نتایج تاثیر غلظتهای مختلف عصاره افسنطین بر مارکرهای سطحی بلوغ سلولهای عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن..... ۹۹
- تصویر شماره (۱۰): نتایج تاثیر غلظتهای مختلف اسانس اکالیپتوس بر مارکرهای سطحی بلوغ سلولهای عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن..... ۱۰۰
- تصویر شماره (۱۱): نتایج تاثیر غلظتهای مختلف اسانس رازیانه بر مارکرهای سطحی بلوغ سلولهای عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن..... ۱۰۱
- تصویر شماره (۱۲): نتایج تاثیر غلظتهای مختلف عصاره سرخارگل بر مارکرهای سطحی بلوغ سلولهای عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن..... ۱۰۲

تصویر شماره (۱۳): نتایج تاثیر غلظتهای مختلف اسانس بومادران بر مارکرهای سطحی بلوغ سلولهای

عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن..... ۱۰۳

Abstract

Background and objectives: cystic echinococcosis (hydatidosis) is one of the most important zoonotic diseases. The main treatment of the hydatidosis is surgery. Finding scolicidal agents without side effects, yet effective, helps and prevent spread of infection. Many scolicidal agents have been used for inactivation of protoscolices during surgery, but most of them had harmful side effects. Currently the use of medicinal plants as a protoscolicidal and alternative chemicals that is harmless to the body and strengthens the immune system is considered. The aim of this study, was to evaluate protoscolicidal effect of ethanolic extract and essential oils of seven plants and also, evaluate the immunomodulatory effect of high scolicidal extracts and essential oils on Antigen Presenting Cells (APCs).

Material and Methods: Protoscolices isolated from sheep livers with hydatid cyst, were collected from slaughterhouses in Qazvin. Six concentrations of ethanolic extract or essential oil of *Melia azedarach*, *Juglans regia*, *Artemisia absintium*, *Foeniculum vulgare*, *Achillea millefolium*, *Eucalyptus globulus*, *Echinacea purpurea* (3,5,10,25,50,100 mg/ml) were used for 10,20,30,40,50,60 minutes exposure time in 37°C. Sodium chloride 9/0% used as a negative control. Viability of protoscolices evaluate with % 0/1 Eosin staining. APCs isolated from mice spleen by MACS method. 100/000 of these cells cultured with high protoscolicidal ethanolic extracts and essential oils in three concentrations (10,50,100µg/ml) for 18-24 hours in 37°C. The results measured by flow cytometry method.

Results : The results of our study showed that *Eucalyptus globulus* killed 100% of protoscolices in 10 min, Whereas *Foeniculum vulgare* and *Artemisia absintium* had 100% scolicidal effect in 10 min and 50, 100 mg/ml respectively. In addition, *Achillea millefolium* and *Echinacea purpurea* extract at 5mg/ml concentration and 40 min exposure time killed 100% of protoscolices. In other hand, this study indicated *Juglans regia* extract had 100% scolicidal effect at 100 mg/ml concentration and 60 min, however *Melia azedarach* extract had no strong protoscolicidal effect. The study of immunomodulatory effect of protoscolicidal extract and essential oil on three maturation markers indicated that *Artemisia absintium* extract and *Foeniculum vulgare* oil increased CD40 at 100µg/ml significantly. *Echinacea purpurea*

extract significantly increased all three markers in 10,50,100µg/ml concentration ($p<0.05$). *Achillea millefolium* increased CD86 in 10,50 µg/ml and decreased it in 100 µg/ml. also this essential oil increased MHCII in all three concentrations. CD40 increased in 10 µg/ml and decreased in 50,100 µg/ml. None of these results were statistically significant. In addition, *Eucalyptus globoulus* essential oil decreased three tested markers in 10 µg/ml. In Higher concentrations, MHCII decreased and CD86, CD40 increased. Although, these results were not significant.

Conclusion: All ethanolic extracts and essential oils had protoscolicidal effect, however, this effect on *Melia azedarach* and *Juglans regia* was not strong. The ethanolic extract of *Echinacea purpurea* increased all three tested markers (CD40,CD86,MHII) and *Artemisia absintium* extract and *Foeiculum vulgar* essential oil increased CD40 in 100 µg/ml significantly ($p<0.05$).

Keywords: Hydatid cyst, Antigen Presenting Cells, Herbal medicine,Immunomodulatory.

فصل اول

مقدمه

هیداتیدوز یک بیماری انگلی مشترک بین انسان و دام بوده و در اثر جایگزینی فرم لاروی انگل اکینوкокوس در اندامهای مختلف از جمله کبد، ریه، مغز و... ایجاد می شود. این بیماری در بسیاری کشور ها از جمله ایران بومی است. در حال حاضر بهترین روش درمان این بیماری عمل جراحی است. در هنگام عمل جراحی، برای جلوگیری از عود بیماری و ایجاد کیست های ثانویه، تزریق مواد پروتواسکولیسیدال به درون کیست ها حیاتی است. تا به امروز مواد اسکولکس کش زیادی به این منظور استفاده شده که هر کدام دارای مزایا، معایب و اثرات جانبی مختلفی می باشند. یافتن ماده پروتواسکولیسیدال موثر، در دسترس و بدون اثرات جانبی می تواند در درمان موثر بیماری راه گشا باشد (۱-۶).

طبقه بندی انگل اکینوкокوس

انگل های جنس اکینوкокوس متعلق به خانواده *Taeniidae* بوده و تا حال چهار گونه جنس

Echinococcus multilocularis *Echinococcus granulosus*

Echinococcus vogeli *Echinococcus oligarthrus* برای این انگل شناسایی شده که

اکینوкокوس گرانولوزوس و مولتی لوکولاریس از مهمترین گونه ها محسوب می شوند (۱).

طبقه بندی انگل اکینوкокوس به شرح زیر می باشد:

Kingdom : Animalia

Phylum : Plathyhelminthes

Class : Cestoda

Order : Cyclophylidea

Family : Taenidae

Genus : Echinococcus

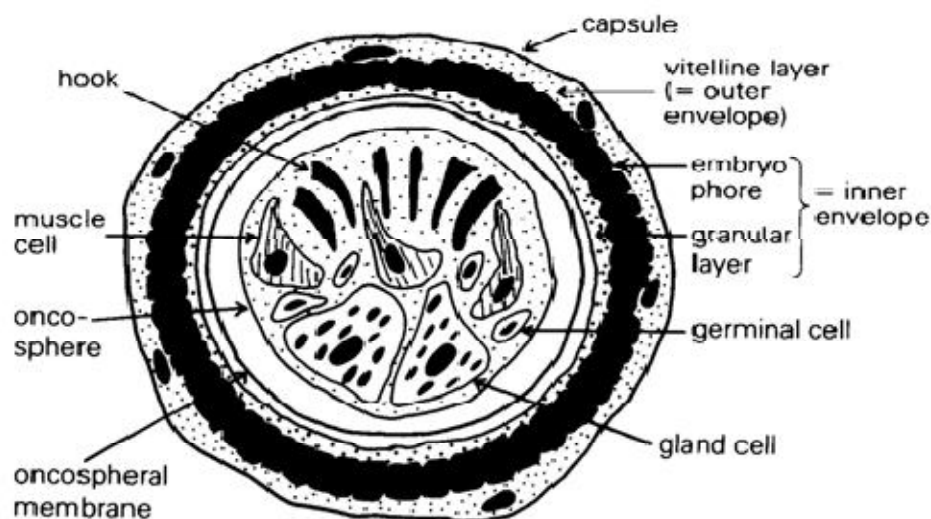
مورفولوژی اکینوкокوس گرانولوزوس

کرم بالغ این انگل حدود ۲/۵-۷ میلی متر بوده و ۳-۴ بندی است. فاقد دستگاه گوارشی بوده و تمام تبدلات متابولیک آن در پوشش سن سیشیال تگومنت خارجی صورت می گیرد. اسکولکس آن دارای چهار بادکش عضلانی و یک روستلوم با دو ردیف قلاب است. این انگل هرمافرودیت بوده و اندازه بند انتهایی (بند بارور) کرم حدود نیمی از طول کرم را شامل می شود. رحم در بند بارور، شاخه شاخه بوده و پر از تخم می باشد. سوراخ های تناسلی در این کرم به صورت متناوب و نامنظم و در کناره بندها قرار دارند (۵). تخم انگل در زمان دفع جنین دار بوده و اندازه آن حدوداً ۳۰-۴۰ μm می باشد. جنین داخل تخم (انکوسفر) ^۱قلابه^۱ بوده و اولین مرحله لاروی است. تخم کرم توسط لایه های مختلفی پوشیده شده است و مهمترین لایه، لایه امبریوفورکراتینه^۲ است که ظاهر تیره رنگی به تخم می دهد (شکل شماره ۱). تخم انگل دارای کپسول خارجی است که تقریباً بلافاصله پس از رها

^۱ hexacanth embryo

^۲ keratinised embryophore

شدن تخم از میزبان، از بین می رود. تخم اکینوкокوس از تخم سایر گونه های تنیا قابل افتراق نیست
(۵).



تصویر شماره (۱): ساختمان تخم اکینوкокوس گرانولوزوس

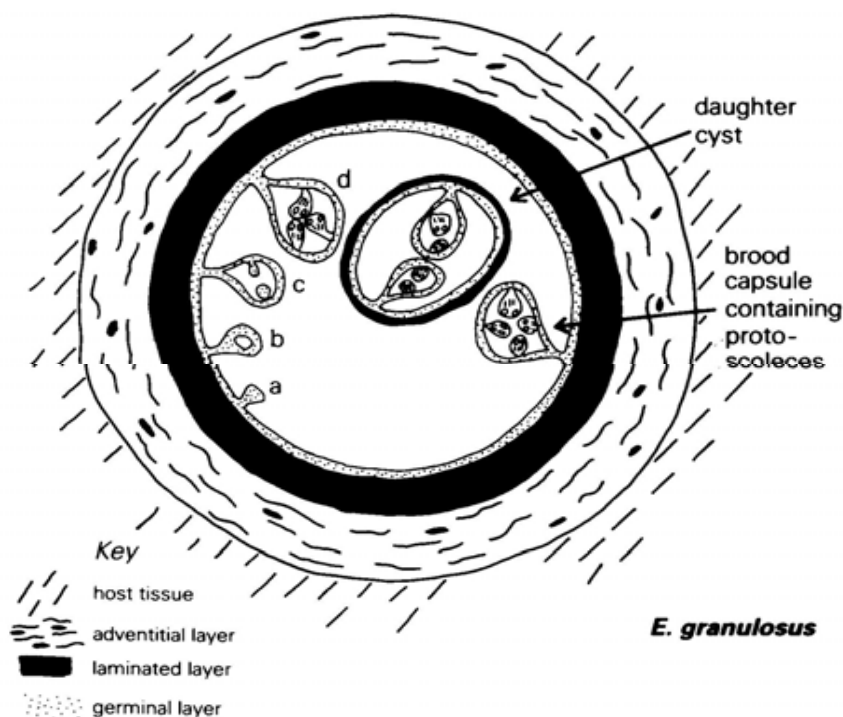
مشخصات فرم لاروی یا متا سستود (کیست هیداتیک)

فرم لاروی یا کیست هیداتیک معمولاً به صورت کیسه ای تک حفره ای و پر از مایع بوده و دارای دو لایه خارجی و داخلی است. لایه خارجی (کوتیکولی یا هیالینی) که توسط لایه فیبروزی با ضخامتهای متفاوت احاطه شده که توسط سلول های میزبان ساخته می شود. لایه داخلی، لایه زایا^۱ بوده که کپسول های زایا^۲ به صورت غیر جنسی از این لایه جوانه زده و پروتواسکولکس ها نیز از لایه داخلی کپسولهای مذکور به وجود می آیند. کپسول های زایا می توانند متصل به لایه ژرمینال باشند اما به صورت شناور در مایع هیداتیک نیز دیده می شوند. گاهی کپسول ها پاره شده و

^۱ Germinal layer

^۲ Brood capsule

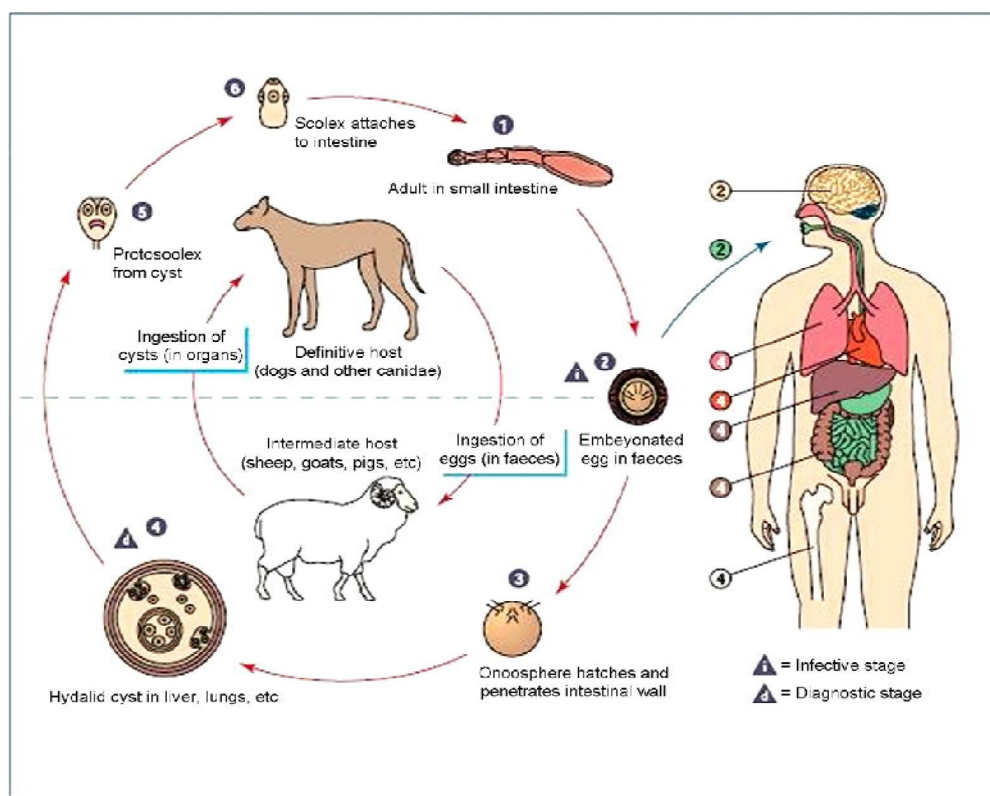
پروتواسکولکس ها در ته مایع کیست ته نشین می شوند که در این حالت به آنها شن هیداتیک گفته می شود (شکل شماره ۲). کیست های بدون سر یا استریل، توانایی ایجاد پروتواسکولکس را ندارند (۶،۵).



تصویر شماره (۲): ساختمان کیست هیداتیک

چرخه تکاملی اکینوкокوس گرانولوزوس

هیداتیدوز بیماری مشترک بین انسان و دام بوده و بین گوشتخواران اهلی و وحشی همچون سگ، روباه، گرگ، شغال و کفتار به عنوان میزبانان قطعی و گوسفند، بز، خوک، گاو میش و سایر حیوانات مزرعه به عنوان میزبانان واسطه، در گردش می باشد. چرخه عمده هیداتیدوز بین سگ - گوسفند - سگ اتفاق می افتد و انسان میزبان واسطه اتفاقی انگل است (۱، ۶، ۷) (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره (۳): چرخه تکاملی انگل اکینوкокوس گرانولوزوس

آلودگی انسان به کیست هیداتید آلوئولار در صورتی اتفاق می افتد که خاک، سبزی، آب یا غذای آلوده به مدفوع روباه و سایر سگ سانان و گربه سانان آلوده به تخم انگل، توسط انسان بلعیده شود. امکان آلودگی دستی - دهانی انسان از طریق تماس با خز و پوست روباه، سگ و گربه آلوده به تخم نیز وجود دارد (۱).

حدود ۵ روز پس از بلع تخم انگل، متاستود به صورت کیسه ای کوچک با قطر $60-70\mu m$ در آمده و اندازه کیست ها پس از استقرار در بدن انسان، به طور معمول بین ۱-۱۵ سانتی متر بوده و این اندازه گاهی ممکن است به بیش از ۲۰ سانتی متر نیز برسد. در چرخه تکاملی انگل، کرمهای بالغ ساکن در روده کوچک میزبان نهایی، تخم ها را همراه مدفوع یا بند بارور خود دفع کرده و این

تخم ها به همراه مدفوع میزبان در محیط قرار می گیرند و توسط میزبان واسط مناسب که در شرایط طبیعی گوسفند، بز، گراز، احشام، اسبها، شتر و گاهی انسان هستند بلعیده می شوند. تخم انگل در روده کوچک میزبان واسط باز می شود. اونکوسفر آزاد شده از تخم، در دیواره روده نفوذ کرده و از طریق جریان خون به اندامهای مختلف بدن مخصوصاً کبد و ریه می رود و تبدیل به کیست یا متاستود می گردد. با رشد کیست، پروتواسکولکس ها و کیست های دختری در داخل آن به وجود می آیند. اگر میزبان نهایی گوشتخوار از اندامهای میزبان واسط آلوده به این کیست ها تغذیه کند پروتواسکولکس ها از کیست ها خارج شده به موکوس روده میزبان می چسبند و طی ۸۴-۳۲ روز به کرملهای بالغ تبدیل می شوند (۳، ۴، ۵).

اپیدمیولوژی هیداتیدوز در جهان

هیداتیدوز یک بیماری انگلی با انتشار جهانی است. بیشترین شیوع بیماری در کشورهایی با آب و هوای گرمسیری مانند آمریکای جنوبی، حاشیه مدیترانه، بخش های مرکزی و جنوبی شوروی سابق، آسیای مرکزی، چین، استرالیا و بخشهایی از آفریقا است. در آمریکای شمالی بیماری به صورت تک گیر در مهاجرانی دیده می شود که از کشورهای اندمیک وارد این کشور شده اند. تعداد موارد ابتلای بیماری در سالهای اخیر افزایش یافته است مثلاً، ابتلا کودکان به اکینوкокوزیس در بلغارستان، بین سالهای ۱۹۷۰ تا اواسط دهه ۹۰ میلادی از ۰/۷ به ۵/۴ مورد در ۱۰۰/۰۰۰ نفر افزایش یافته است. تخمین زده می شود بیش از یک میلیون نفر در جهان مبتلا به این بیماری باشند (۳). در مناطقی که دامداری سنتی رواج دارد، گردش آزادانه سگها در مزارع و تغذیه آنها از لاشه حیوانات آلوده باعث

افزایش شیوع بیماری در سگها می شود. علاوه بر آن عوامل دیگری مثل افزایش سن میزبان، موقعیت جغرافیایی و شرایط آب و هوایی و شیوه های کشاورزی در شیوع بیماری موثرند (۴،۳).

انتشار هیداتیدوز در ایران

هیداتیدوز در ایران یک بیماری اندمیک بوده و ۱٪ عمل های جراحی انجام شده در بیمارستانها به دلیل ابتلا به کیست هیداتیک می باشد. گزارشات، افزایش موارد ابتلا به این بیماری طی سالهای اخیر را نشان می دهند. به طور مثال در استان همدان تعداد موارد هیداتیدوز بین سالهای ۱۹۸۲ تا ۱۹۹۲، ۵۵ مورد گزارش شده، در حالی که بین سالهای ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۶، این موارد به ۱۷۹ مورد افزایش یافته است. در یک مطالعه دیگر، کل موارد بیماری در ایران بین سالهای ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۵، ۲۰۸۳ مورد گزارش شده است. در استانهایی که فعالیت دامداری در آنها بیشتر است، تعداد مبتلایان بیماری نیز بیشتر می باشد. شیوع هیداتیدوز در شهرهای همدان، کاشان و بابل به ترتیب ۱/۳۳، ۳ و ۱/۱۸ مورد در ۱۰۰/۰۰۰ نفر بوده و شیوع آن در کل ایران، ۰/۶۱ در ۱۰۰/۰۰۰ نفر تخمین زده می شود. موارد ابتلای اکینوкокوزیس در استان خراسان رضوی بین سالهای ۲۰۰۲-۱۹۸۰، ۱۷۵۹ نفر بود. بیشترین ارگانهای درگیر در بیماران ایران، کبد و بعد از آن ریه بوده و اغلب مبتلایان ۴۰ - ۲۰ ساله هستند که این آمار، با آمار جهانی بیماری مطابقت دارد. به طور کلی زنان به دلیل سر و کار داشتن بیشتر با سبزیجات، خاک و حیوانات خانگی مثل سگها، درصد بیشتری از مبتلایان را تشکیل می دهند (۸).

علائم بیماری و روش های تشخیص

کبد بیشترین محل ایجاد کیست هیداتیک است، اما کیست ها در ارگانهای دیگری از جمله ریه، طحال، قلب، استخوان و حتی سیستم عصبی مرکزی نیز تشکیل می شوند. ممکن است عفونت کبد و ریه در کودکی رخ دهد، اما علامت دار شدن آنها در دوران بزرگسالی اتفاق بیافتد. در واقع تنها ۲۰-۱۰٪ موارد بیماری در افراد کمتر از ۱۶ سال تشخیص داده می شوند. تشخیص کیست رابطه ای مستقیم با محل قرارگیری آن و اندازه کیست دارد. مثلاً کیست های سیستم عصبی مرکزی و چشم زودتر علامت دار شده و سریعتر نیز تشخیص داده می شوند. کیست های داخل جمجمه ای و نخاعی علائمی مانند سردرد و درد پشت دارند. کیست ها در عضلات اسکلتی باعث تورم و شکستگی های پاتولوژیک، در سیستم قلبی عروقی سبب آنژین، مشکلات تنفسی و تپش قلب و در سیستم کلیوی و طحال باعث درد در یک چهارم بالا و سمت چپ شکم می شوند. میزان رشد کیست بین ۵-۱ cm در سال متغیر است (۳،۱۰). وجود توده کیستی در افرادی که سابقه تماس با سگ گله و زندگی در مناطق اندمیک اکینوکزیس را داشته اند، به تشخیص بیماری کمک می کند. پزشک باید علائم بیماری را از بیماری هایی با نشانه های مشابه مثل سل، آبسه و نئوپلاسم های خوش خیم یا بدخیم تشخیص دهد. کیست ها ممکن است در اثر پارگی خود به خودی به طور نامحسوس تخلیه و کلسیفیه شوند. پارگی کیست از طرف دیگر می تواند منجر به ایجاد کیست های ثانویه شود. آزاد شدن پروتواسکولکسهای داخل مایع هیداتیک می تواند کیست جدید در بدن ایجاد نماید (۳،۶).

برای تشخیص هیداتیدوز، از روش های مختلف تهاجمی و غیر تهاجمی استفاده می شود. در تشخیص یک توده کیستی می توان از روشهای سونوگرافی، توموگرافی کامپیوتری یا تصویربرداری با

اشعه ایکس استفاده کرد. از سونوگرافی برای تشخیص کیست های کبدی و داخل شکمی استفاده می شود. روش های مختلف ایمونولوژیک مانند الایزا^۱ نیز برای تشخیص هیداتیدوز استفاده می شوند. در این روش از آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک استفاده می گردد. این آزمایش حساسیتی حدود ۹۵٪ دارد اما ویژگی آن زیاد نیست. برای برطرف کردن این نقص در ویژگی تست، از آنتی ژن B خالص شده و تکنیک های دیگری مثل ایمنوبلات و ایمنوالکتروفورز استفاده شد، ولی این تغییرات حساسیت این آزمایش را کاهش داد. به علاوه در ۲۰-۱۰٪ افراد با کیست کبد و ۴۰٪ افرادی که کیست ریه دارند و همین طور در کیست های مغز، داخل استخوان و یا کیست های کلسیفیه، آنتی بادی IgG قابل تشخیص ترشح نمی شود و این عدم ترشح آنتی بادی، باعث ایجاد نتایج منفی کاذب در آزمایش می گردد. در بررسی های معمول کیست، برای بدست آوردن نتایج قابل اعتماد از دو تست به طور همزمان استفاده می گردد (۹).

در ایران برای تشخیص هیاتیدوز از روشهای ELISA و FAST-ELISA، DOT-ELISA، Enzyme-linked Immunoelctro Transfer Blot (EITB) استفاده می شود. روش الایزا در ایران با آنتی ژن B انجام می گیرد که مقرون به صرفه و در دسترس تمام آزمایشگاهها است (۸). در یک روش دیگر، با استفاده از سوزن نازکی که با اولترا سونوگرافی هدایت می شود، مقداری از مایع داخل کیست آسپیره شده و جهت مشاهده پروتواسکولکس، قلاب، تشخیص آنتی ژن اکینوкокوس یا کشف DNA انگل در آزمایشگاه بررسی می گردد. اما در این روش احتمال تشکیل کیستهای ثانویه وجود دارد (۹).

^۱ ELISA

درمان

-روش جراحی:

از مزایای این روش، خارج کردن کیست و درمان کامل آن می باشد. کیست های ساده که ارگانهای زیادی را درگیر نکرده اند و در مکانهای خطرناکی قرار نگرفته اند گزینه مناسبی برای جراحی می باشند. پرسیستکتومی^۱ روش معمول جراحی است اما درناژ^۲ ساده, Capitonage, Marsupialization, و قطع عضو درگیر روشهای دیگری هستند که با توجه به محل کیست مورد استفاده قرار می گیرند. درمان جراحی در زنان باردار، بیماران مبتلا به نقص ایمنی و بیمارانی که کیست آنها دور از دسترس جراح می باشد، قابل انجام نیست. در چنین شرایطی روش PAIR^۳ یا دارو درمانی انجام می گیرد (۹،۳). روش PAIR در اواسط دهه ۸۰ میلادی معرفی شد. در این روش ابتدا با کمک سونوگرافی سوراخی در کیست ایجاد شده و حدود ۱۵-۱۰ میلی لیتر از مایع هیداتیک آسپیره می گردد. در ادامه یک ماده پروتواسکولیسید با همان مقدار به درون کیست تزریق می گردد. این مایع بعد از گذشت حدود ۵ دقیقه مجدداً تخلیه می گردد. با توجه به تفاوت سرعت عملکرد هر یک از مواد پروتواسکولیسید، مدت زمان باقی ماندن این ماده در کیست متفاوت است. توصیه بعضی متخصصین در این روش، برای جلوگیری از ایجاد کیست های ثانویه دارو درمانی بعد از عمل می باشد.

^۱ Pericystectomy

^۲ Drainage

^۳ Puncture Aspiration Injection Reaspiration

روش PAIR در کیست های تک حفره ای کبدی با قطر کمتر از ۵ سانتی متر و همینطور کیست های چند حفره ای که در دسترس جراح هستند قابل انجام است. در کیست هایی که با مجاری صفراوی در ارتباطند و یا در محلهایی از کبد قرار دارند که جراحی آنها خطرناک است، کیست های آزاد در محوطه شکمی، کیست های ریوی، قلبی و مغزی و کیست هایی که در ستون مهره ها قرار گرفته اند این روش انجام نمی شود.

روش دیگر جراحی Percutaneous thermal ablation است. این روش شیوه درمانی جدیدی است که در آن لایه ژرمینال با استفاده از امواج رادیویی سوزانده می شود. در این روش نیازی به تزریق مواد پروتواسکولیسید مضر به کیست نیست ولی نیاز به مطالعه بیشتر دارد (۹).

- درمان دارویی:

معرفی ترکیبات بنزیمیدازول کاربامات در اوایل دهه ۷۰ میلادی به عنوان ترکیباتی موثر بر ضد اکینوکوس گرانولوزوس پیشرفتی بزرگ در درمان بیماری بود. درمان با ترکیبات بنزیمیدازول مثل آلبندازول و یا مبندازول، در بیمارانی که شرایط جراحی ندارند و در چندین نقطه از بدن کیست های متعددی دارند توصیه می شود. اما کیست هایی که در استخوان قرار دارند، به درمان دارویی پاسخ خوبی نمی دهند. WHO میزان آلبندازول مصرفی را روزانه ۱۰-۱۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و در دو دوز منقسم، پس از غذا برای مدت ۳-۶ ماه توصیه کرده است (۹). در زنان باردار، بیماریهای مزمن کبدی و مشکلات مغز استخوان نمی توان از درمان دارویی استفاده کرد (۳). داروها در کنار خواص درمانی، دارای عوارض جانبی نیز هستند. از جمله این عوارض، افزایش میزان

آنزیمهای SGOT و SGPT، درد و نفخ شکم، سردرد و سرگیجه، کهیر، زردی، آلوسپی، ترومبوسایتوپنی یا کاهش تعداد پلاکت، افزایش ضربان قلب، سوءهاضمه و تب است (۱۱، ۱۲، ۱۳).

پاسخهای ایمنی میزبان در برابر کرمهای انگلی

توانایی انگل های کرمی در تحریک سیستم ایمنی میزبان پستاندار، از عوامل بقا و مقاومت آنها در میزبان است. الگوهای کلی سرکوب کردن سیستم ایمنی توسط کرمها مشخص شده است. به طور مثال عفونت با شistosوما مانسونی و بروگیا مالایی منجر به عدم پاسخ جمعیت سلول های T در خون محیطی می گردد (۱۴). اکینوکوس چرخه زندگی پیچیده ای در میزبان واسط و نهایی دارد. میزبان واسط فرآورده های زیادی بر علیه اکینووکوکوس گرانولوزوس تولید می کند و در مقابل، انگل نیز راههای زیاد و موثری برای فرار از سیستم ایمنی دارد. مکانیسمهایی مثل، تقلید آنتی ژنیک، تهی سازی آنتی ژنیک^۱، تنوع آنتی ژنیک^۲، نادیده گرفته شدن توسط سیستم ایمنی^۳، منحرف کردن سیستم ایمنی و تخریب سیستم ایمنی از جمله این راههای فرار است.

از ویژگی های مهم عفونت اکینووکوس گرانولوزوس این است که این انگل از گونه های زیادی از پستاندارن به عنوان میزبان واسط استفاده می کند. این گونه ها بسیار سریع خود را با میزبان واسط وفق داده و کیست های کشنده ای تولید می کنند. به طورمثال کیسه داران استرالیایی بعد از اسکان اروپاییان در این قاره جزو میزبانان حساس به این انگل قرار گرفته اند. همچنین عفونت مزمن کیست

^۱Antigenic depletion

^۲ Antigenic variation

^۳ Immunologic indifference

که گاهی حتی تا ۵۳ سال نیز طول می کشد، باعث می شود انگل تا مدت زیادی در میزبان زنده باقی بماند (۱۳، ۱۴).

ایمنی بر علیه کیست هیداتیک

۱- پاسخ آنتی بادی: اولین ایمنوگلوبین ترشح شده در برابر مایع کیست هیداتیک و آنتی ژنهای جنینی IgM و IgG است که بعد از ۲ و ۱۱ هفته به ترتیب در موش و گوسفند آلوده به تخم یا انکوسفر اکینوкокوس گرانولوزوس تولید می گردد. این آنتی بادی ها نقش مهمی در کشتن انگل و دفاع علیه اکینوкокوس گرانولوزوس دارند. هرچند میزان آنتی بادی بر ضد انکوسفر در مراحل اولیه زیاد نیست. مکانیسمهایی که باعث از بین بردن انگل می شود ممکن است شامل واکنشهای وابسته به آنتی بادی و سایتوتوکسیسیتی با واسطه سلول باشد. در مرحله مزمن اکینوкокوزیس کیستیک، میزان زیاد آنتی بادی به خصوص IgG، IgM و IgE ترشح می شود و زیر کلاسه های IgG1 و IgG4 بیشترین غلظت را دارند که در تشخیص سرولوژیک این بیماری نیز حائز اهمیت اند (۱۳، ۱۴، ۱۵).

۲- پاسخ ایمنی سلولی و Th2: در مراحل اولیه عفونت اکینوкокوزیس اینفیلتراسیون لنفوسیت ها، ائوزینوفیل ها، نوتروفیلها، ماکروفاژها در انسان و گوسفند مشاهده می شود. گزارشات کمی درباره سیتوکاین های تولید شده در مراحل اولیه (عفونت دهانی با تخم) وجود دارد. آلودگی با تخم اکینوкокوس مولتی لوکولاریس باعث ترشح گاما اینترفرون، اینترلوکین ۲ و اینترلوکین ۴ به مقدار کم در مراحل اولیه و به مقدار زیاد در مراحل آخر عفونت می شود. تحقیقات بیشتر در زمینه ایمونولوژی عفونت های کرمی مشخص کرد که Th2 نقش بسیار مهمی در مزمن شدن عفونت کرمی دارد. مهمترین شاخصه اکینوкокوزیس مزمن در انسان، وجود گاما اینترفرون، اینترلوکین ۴ و اینترلوکین ۱۰

است. مشخص نیست که چرا عفونت هیداتیک می تواند مقادیر زیادی از سایتوکاینهای Th1 و Th2 ایجاد کند، ولی افزایش یکی از این دو رده سلول موجب کاهش دیگری می شود. میزان آنتی ژنهای ترشح شده نقش کلیدی در ایجاد ایمنی را ایفا می کند. به طور مثال آنتی ژن B مایع هیداتیک باعث تولید Th2 می گردد. نقش اینترلوکین ۱۰ در عفونت مزمن هنوز به طور کامل مشخص نیست اگرچه یک تحقیق نشان داد که IL10 می تواند در پاسخ ایمنی Th1 بر علیه انگل اختلال ایجاد کرده و به بقای انگل در بدن انسان کمک کند (۱۳،۱۴،۱۵،۱۶).

ارتباط سایتوکاین ها با تولید آنتی بادی

مطالعات نشان داد که IL12 و اینترفرون گاما پاسخ IgG2a اختصاصی بر علیه انگل در موش های آلوده به پروتواسکولکس اکینوкокوس گرانولوزوس ایجاد می کنند. پاسخ Th2 علامت مهمی از مرحله مزمن عفونت اکینوкокوس است. آزمایشات نشان داده اند که بیماران با کیست غیر فعال دارای پاسخ Th1 هستند، در حالی که اگر کیست فعال شود مخلوطی از پاسخ های Th1/Th2 و Th0 را دارد. در بیمارانی که با ترکیب آلبندازول/مبندازول درمان شدند Th1 سلول غالب است که نشان می دهد پاسخهای Th1 نقش موثری در از بین بردن کیست دارند، همچنین مطالعات نشان داده که Th1 با مقاومت به بیماری و Th2 با مزمن شدن بیماری مرتبطند (۱۵،۱۶). مرحله کیستی اکینوкокوس تولید سایتوکاینهای IL4، IL5، IL10 و IL13 و آنتی بادی های IgE، IgG4، IgG1 و افزایش جمعیت ائوزینوفیل ها، ماست سل ها و فعال کردن ماکروفاژها را سبب می گردد. مشخص شده سلول دندریتیک به تنهایی می تواند منجر به تمایز سلول های Th2

شود. در واقع سیگنالهای سلول دندریتیک می تواند منجر به تولید $Th2$ از سلول های T نابالغ^۱ گردند (۱۶،۱۵).

سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای (سلول های دندریتیک)

بعضی انواع گلبولهای سفید دارای دودمان مشترکی هستند. سلول های دندریتیک، ماکروفاژها و منوسیتها به عنوان فاگوسیتهای تک هسته ای شناخته می شوند. پیش ساز فاگوسیتهای تک هسته ای سلول های میلوئیدی مغز استخوان هستند. در بافتهای مختلف این سلول ها، اشکال فنوتیپی و همین طور عملکرد متفاوتی دارند. سلول دندریتیک به عنوان یکی از این فاگوسیتهای تک هسته ای، برای ارائه آنتی ژن به لنفوسیتهای T و راه اندازی و کنترل پاسخ ایمنی اختصاصی شده اند (۱۴). تفاوت فنوتیپی بین سلول های دندریتیک انسان و ماکروفاژها با ایمنوهیستوشیمی قابل تشخیص است. مطالعات اخیر نشان داده که بخش کوچکی از سلول های دندریتیک در تعداد زیادی از پستانداران به طور مشترک وجود دارد. این سلول ها در انسان، $MHCII$ (HLA-DR) را به مقدار زیاد و مارکر $CD3$ مربوط به $Tcell$ ، $CD19/20$ مارکر $B cell$ و $CD56$ سلول های کشنده طبیعی را کم دارند. HLA-DR در سلول های دندریتیک هر دو رده پلاسموئید و میلوئیدی وجود دارد (۱۷). بیشترین اطلاعاتی که در مورد سلول های دندریتیک بدن انسان وجود دارد مربوط به سلول های خالص سازی شده خون محیطی است چرا که دسترسی به سلول های ارگانهای لنفوی انسان (عمدتاً در طحال) آسان نیست. خون انسان دارای ۲ دسته اصلی سلول های دندریتیک است: گروه اول با $IL - 3R$ و بیان مقدار کمی $CD11c$ مشخص می شوند که شبیه سلول های pDC در موش

^۱ Naïve

است و گروه دوم مقدار زیادی CD11c دارد که احتمالاً معادل CD11b+ در سلول های دندریتیک موش است (۱۸).

بلوغ و تمایز سلول های دندریتیک با لیپوپلی ساکارید تحریک می شود. این تاثیر شامل کاهش بیان CD1a و افزایش بیان CD86 و میزان کمی از سلول های CD83+ و کم کردن میزان ایتروکین IL-12p70 و TNF α می شود. به علاوه مایع هیالاتیک می تواند سبب مهار تمایز منوسیت های انسانی به سلول دندریتیک و جلوگیری از ترشح IL6، IL12 و یا پروستاگلاندین (PGE2)E2 در پاسخ به تحریک LPS شود.

سلول های دندریتیک نابالغ در طی مراحل رشد و بلوغ در بافت های لنفاوی ثانویه برای به دام انداختن آنتی ژن^۱ و تبدیل شدن به سلول های نگهبان آماده می شوند. این سلول ها در بین ماکروفاژها، سدهای اپیتلیال که اغلب راه مناسبی برای ورود پاتوژن ها هستند، قرار می گیرند. اگرچه در مجرای روده ای - معده ای^۲ جایگاه این سلول ها در بافت زیر اپیتلیال و در زیر سلول های M است، سلول های دندریتیک می توانند با تشخیص مستقیم پاتوژن توسط الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژن^۳ (PAMPS) مثل LPS یا ترکیبات دیواره سلولی توسط گیرنده های Toll-like (TLR) یا به طور غیر مستقیم از طریق گیرنده های سایتوکاین های التهابی و کموکاینها فعال شوند. سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای به محض فعال شدن با PAMPS، ترشح سایتوکاینهای التهابی مثل IL-1 β ، TNF-a، IL-6 و IL-12 و کموکاینها مثل MIP-1 α ، MIP-1 β و MCP-1، RANTES را شروع می کنند. بعد از آن سایتوکاین های ضد التهابی، عمدتاً

¹ Antigen capture

² Gastrointestinal

³ Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPS)

IL10، برای مقابله با محرک های بیماری زا، از سلول های دندریتیک ترشح می شوند، بنابراین از القای پاسخ شدید ایمنی و التهابی جلوگیری می کند. سلول های دندریتیک به واسطه رو به رو شدن با پاتوژن فعال و بالغ می شوند. پروسه پیچیده ای با دو هدف ۱- انتقال سلول دندریتیک های نابالغ از بافت های محیطی به اندام های لنفاوی ثانویه ۲- عمل به عنوان سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای (APC)^۱ برای عرضه به سلول های T نابالغ انجام می گیرد. پس از رسیدن به هدف اول، سلول های دندریتیک فعال توانایی فاگوسیت کردن را از دست می دهند و ساختار چسبنده شان، بیان گیرنده های کموکاین لنفوتیدی مثل CCR7 را افزایش می دهد. برای رسیدن به هدف دوم، سلول های دندریتیک بیان مولکول های CD40، CD8 و CD86 که کمک محرک هستند و همین طور سنتز و انتقال مولکول های MHC به سطح سلول را افزایش می دهد. همزمان تخریب مولکول های MHCII کاهش و نگهداری پپتیدهای کمپلکس MHC روی سطح سلول به مدت چندین روز افزایش میابد (۱۳).

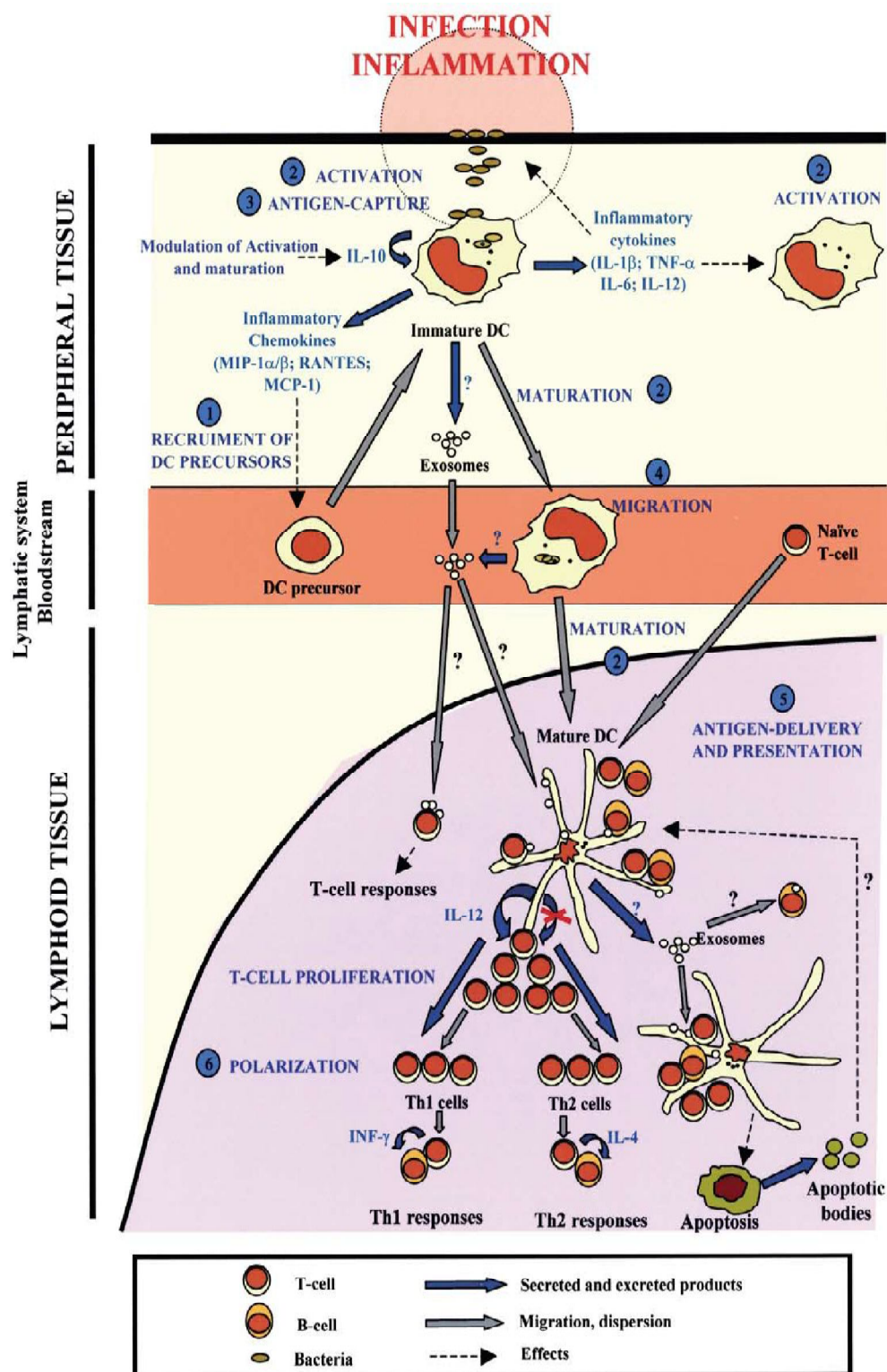
در طحال و مغز استخوان سلول های دندریتیکی که به آنتی ژن های خودی واکنش می دهند با انتخاب منفی^۲ حذف می شوند. با توجه به اینکه انتخاب منفی ۱۰۰٪ نیست سلول هایی که در این روند حذف نشدند می توانند وارد جریان خون شده و ایجاد بیماری خود ایمنی کنند، به همین علت در ارگان های لنفاوی ثانویه با سرکوب یا حذف کردن با دخالت لنفوسیت های Tregulatory پاک می شوند. گفته می شود که سلول های دندریتیک در این روند نیز نقش مهمی ایفا می کنند (۱۸).

¹ Antigen-presenting cells

² Negative selection

نقش دیگر این سلول ها در پایش ایمنی^۱ است. خون محل مهمی برای گسترش بیماری در بدن است. بیماری هایی که از طریق حشرات منتقل می شوند مثل مالاریا، لیشمانیا یا تریپانوزوم و باکتریایی مثل یرسینیا، بورلیا و ویروسهایی مثل عوامل ایجاد کننده تب زرد و انواع آنسفالیت فقط نمونه های کوچکی از این بیماریها هستند. طحال و سلول های دندریتیک آن محلی برای کشف این عوامل در خون است (۱۸). از آنجایی که نقش سلول های عرضه کننده حفره ای آنتی ژن (سلول های دندریتیک) در هدایت سیستم ایمنی و ایمنی علیه انگل ها خصوصاً اکینوкокوس گرانولوزوس مشخص شده، یافتن دارویی که همزمان توانایی از بین بردن انگل و همینطور توانمند ساختن سیستم ایمنی علیه میزبان را داشته باشند گام بزرگی برای مبارزه و درمان مناسب بیماری خواهد بود.

¹ Immunosurveillance.



تصویر شماره (۴): عوامل موثر بر بلوغ سلول های دندریتیک

بیان مسئله

هیداتیدوز یکی از مهمترین بیماری های مشترک بین انسان و دام بوده و از انتشار جهانی برخوردار است. این بیماری با جایگزینی فرم لاروی اکینوкокوس گرانولوزوس در اندام هایی مانند کبد، ریه، مغز، کلیه و ... ایجاد می گردد. در حال حاضر موثرترین روش درمانی هیداتیدوز عمل جراحی است (۱، ۲، ۳). قبل از عمل جراحی انتخاب مواد پروتواسکولیسیدال موثر و کم ضرر و تزریق آنها به داخل کیستها خطر نشت پروتواسکولکس های زنده را کاهش داده و این مسئله برای بسیاری از جراحان مهمترین تکنیک جراحی محسوب می شود (۶، ۱۲، ۱۳). مواد پروتواسکولیسیدال زیادی برای غیر فعال کردن پروتواسکولکس ها مورد استفاده قرار گرفته ولی ماده ای که استفاده از آنها کاملاً موثر و بی ضرر باشد تا حال گزارش نشده است. چنانکه فرمالین، پراکسید هیدروژن، ستریماید، الکل خالص، سالین هیپرتونیک و نیترات نقره به عنوان مواد پروتواسکولیسیدال به کار رفته ولی عوارض جانبی حاصله از آنها استفاده از مواد مذکور را محدود ساخته است (۱۹، ۲۰، ۲۱). در حال حاضر استفاده از مواد دارویی طبیعی به عنوان جایگزین مواد مصنوعی مورد توجه قرار گرفته است. چنانکه محققین در ایران و سایر کشورها گیاهان نعنا، پیاز، سیر، آویشن، زیتون، زرشک، زنیان، ریحان، آقوی، سماق، و زنجبیل را به عنوان مواد پروتواسکولیسیدال گزارش نموده اند و برای اطمینان از بی ضرر بودن آنها برای بدن، تحقیقات بیشتر در مورد گیاهان مذکور را پیشنهاد نموده اند (۲۱-۳۷).

در تحقیق حاضر اسانس یا عصاره گیاهان دارویی آزاد درخت (*Melia azedarach*)،

برگ گردو (*Juglans regia*)، افسنتین (*Artemisia absintium*)،

رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، بومادران (*Achillea millefolium*)،

اکالیپتوس (*Eucalyptus globoulus*) و سرخارگل (*Echinacea purpurea*) که اثرات ضد کرمی، ضد تک یاخته ای، ضد حشره ای و ضد قارچی آنها قبلاً مشخص شده (۷۷-۴۴)، به عنوان مواد پروتواسکولیسیدال مورد آزمایش قرار گرفتند.

سلولهای عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای (سلولهای دندریتیک)، نقش مهمی در هدایت پاسخ ایمنی بدن داشته و می توانند در جهت دهی مناسب پاسخ های دفاعی در تخریب انگل موثر باشند لذا شناسایی مارکرهای موثر در مهار عفونت های انگلی از اهمیت خاصی بر خوردار می باشند. در مطالعات گذشته مشخص شده که کیست هیداتیک با ترکیبات و ترشحات خود پاسخ های متفاوتی از سلول های ایمنی را ایجاد می کند و ترجیحاً سلول های غیر عملکردی موثر بر تخریب انگل را فعال نموده و با انحراف و همینطور مهار برخی از پاسخ های ایمنی، شرایط را برای ایجاد عفونت های مزمن فراهم می آورد. یکی از این مکانیسم ها که در فرار انگل از پاسخ های ایمنی موثر است، تغییر بالانس پاسخ های ایمنی از Th1 به Th2 میباشد (۱۸-۱۴). پاسخ ایمنی موثر در مهار انگل، فعال شدن سلول های Th1 و دیگر سلول های کارگزار از قبیل سلول های عرضه کننده آنتی ژن^۱ یا سلول های دندریتیک می باشد. با توجه به اینکه یکی از راههای فرار انگل اکینوкокوس از پاسخ ایمنی مناسب، اختلال در بلوغ و عرضه آنتی ژن توسط سلول های دندریتیک و ایجاد یک پاسخ نامناسب ایمنی از نوع Th2 می باشد، لذا بر آن شدیم تا در این مطالعه ابتدا اسکرین و شناسایی گیاهان دارویی دارای اثر پروتواسکولیسیدال انجام شده و سپس اثر ایمنومدولاتوری گیاهان موثر بر پروتواسکولکس ها بر روی بلوغ سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای مورد بررسی قرار گیرد.

^۱ Antigen Presenting Cell(APC)

فصل دوم

مروری بر متون

آزاددرخت (*Melia azedarach*)



گیاهی از خانواده سنجد تلخیان (Meliaceae) است و در نواحی مختلف کشور با نامهای متفاوتی از جمله شال پستانه (زنوز)، شیطان زیتون (لاهیجان)، شجره حره (عربی)، شال زیتون، دیوزیت، شال سنجد (مازندران)، وزیتون تلخ (تهران) شناخته می شود (۳۸، ۴۲). منشا اصلی گیاه، نواحی شرق هند، ایران، آسیای صغیر، چین و مدیترانه است. این گیاه در ایران در نواحی شمالی، لاهیجان، مازندران (نور) و بندرعباس می روید (۳۸). درختی است زیبا با ارتفاع ۱۵-۱۰ متر و دارای برگهای به طول ۲۰-۵۰ سانتی متر که مرکب از ۷-۵ برگچه نوک تیز و دندانه دار است. گلها به رنگ آبی تا بنفش و مجتمع به صورت خوشه ای مرکب و به طول حداکثر ۲۰ سانتی متر هستند. هرگل دارای ۵-۶ گلبرگ با حالت افتاده و دارای ۱۰-۱۲ پرچم است. میوه این درخت سخت، بیضوی به بزرگی

یک نخود و تقریباً زرد رنگ است که هسته ای سخت دارد. قسمت مورد استفاده دارویی این گیاه، پوست، ریشه، ساقه و برگ گیاه است (۴۲).

ترکیبات شیمیایی آزاد درخت، تانن، آلکالوئید آزارین، ماده تلخی به نام مارگوزین و مواد رزینی و لیمونوئیدهایی مثل گدونین می باشند. آزاددرخت با غلظت $0.1 \text{ mg}/\mu\text{l}$ به عنوان داروی موثر ضد مالاریا مورد استفاده قرار گرفته است. از پوست آزاد درخت به عنوان داروی مقوی و نیرودهنده، قابض، تب بر، ضدکرم و ازبرگ له شده آن برای التیام زخمها و تسکین روماتیسم استفاده می شود (۴۲، ۴۳).

درسال ۱۹۹۷، Hammond و همکاران دراسکاتلند، طی یک مقاله مروری به بررسی اثر میوه پودر شده و عصاره اتانولی آزاد درخت در جوجه هایی که به طور تجربی به *Ascaridia galli* آلوده شده بودند، پرداختند. در مطالعه مذکور دوز گیاه استفاده شده $20 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ بود که ۱۵ روز پس از درمان، میوه پودر شده و عصاره اتانولی گیاه مذکور به ترتیب باعث کاهش دفع تخم به میزان ۵۸٪ و ۶۸٪ در آزمایش مدفوع جوجه ها شدند. همچنین محققین مذکور در یک مطالعه دیگر اثر میوه پودر شده آزاد درخت بر روی نماتوهای *Trichostrongylus*, *Trichuris*, *Chabertia* و *Haemonchus* را در بز مورد بررسی قرار دادند. دوز مورد استفاده $30 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ بود. نتیجه این مطالعه نشان داد که این گیاه پس از گذشت ۳، ۱۰ و ۱۵ روز به ترتیب سبب کاهش ۷۹٪، ۹۶٪ و ۱۰۰٪ از تخم کرمهای مذکور شدند (۴۴).

Cala و همکاران در سال ۲۰۱۲ مطالعه ای با هدف بررسی اثر ضد کرمی عصاره هگرنی آزاددرخت، با استفاده از روش ممانعت از باز شدن تخم و پوست اندازی لارو انگل های روده ای

گوسفند(همونکوس کونتورتوس و تریکوسترنزیلوس) انجام دادند. نتایج مطالعه نشان داد که غلظت‌های $572/2 \mu\text{g/ml}$ و $1137/8$ عصاره گیاه مذکور به ترتیب از بازشدن 50% و 99% تخمها و همچنین با غلظت‌های $0/7 \mu\text{g/ml}$ و $60/8$ به ترتیب از پوست اندازی 50% و 99% درصد لاروها در مدفوع جلوگیری کردند (۴۵).

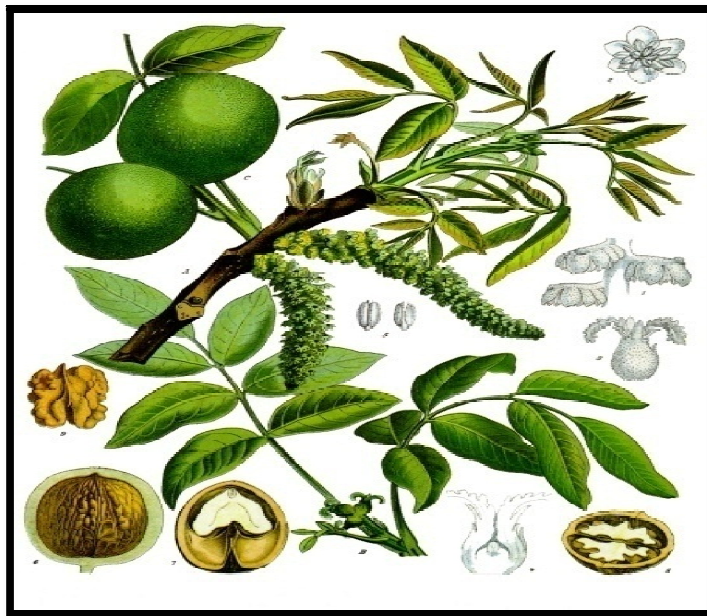
در سال ۲۰۰۳، Szewczuk و همکاران در آرژانتین اثر غلظت‌های $0/1$ ، $0/2$ و $0/4$ درصد از عصاره گیاه آزاددرخت و داروی پپیرازین را روی دو انگل *Taenia solium* و *Pheretima posthuma* (کرم خاکی) آزمایش و مقایسه کردند. نتایج نشان داد که پپیرازین فسفات با غلظت‌های $0/1\%$ و $0/2\%$ به ترتیب بعد از 80 و 56 دقیقه انگل های فوق را از بین برد ولی این مدت زمان برای تاثیر عصاره گیاه به ترتیب 52 و 32 دقیقه بود (۴۶).

Wandscheer و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر ضد لاروی عصاره اتانولی میوه آزاد درخت و گیاه چریش (*Azadirachta indica*) را روی پشه *Aedes aegypti* بررسی کردند. عصاره ها در غلظت‌های $0/0033$ تا $0/05$ گرم درصد در محیط آبی و در شرایط مساوی، روی لاروها آزمایش شدند. نتایج نشان داد که آزاد درخت اثر ضد لاروی کمتری نسبت به گیاه چریش دارد (۴۷).

مطالعه دیگری در برزیل توسط Maciel و همکاران در سال ۲۰۰۶ روی فعالیت تخم کشی و لارو کشی عصاره هگزانی و اتانولی میوه آزاددرخت و همچنین عصاره کلروفورمی و اتانولی برگهای گیاه مذکور برروی انگل *Haemonchus contortus* انجام شد. در این مطالعه غلظت‌های $3/12$ ، $6/2$ ، $12/5$ ، 25 و 50 میلی گرم در میلی لیتر گیاه مذکور استفاده شد. عصاره اتانولی میوه گیاه در غلظت‌های 25 و 50 mg/ml سبب ممانعت از باز شدن 100% تخمها شد. عصاره اتانولی برگ گیاه

مذکور در همین غلظتها به ترتیب باعث از بین رفتن ۷۶/۷۳٪ و ۹۱/۶۴٪ لاروها شد. بررسی ترکیبات شیمیایی گیاه نشان داد که عصاره این گیاه دارای ترکیبات تانن، تری ترپن و آلکالوئید می باشد. محققین گزارش کردند که این تاثیر ضد انگلی ممکن است مربوط به ترکیبات مذکور باشد (۴۸).

گردو (*Juglans regia*)



از خانواده گردوئیان (Juglandaceae) بوده و نام کهن آن جوذر می باشد و با نام جوز نیز شناخته می شود. دارای ۲۱ گونه است که همگی دارای میوه خوراکی هستند. پوسته تنه نهال گیاه قهوه ای بوده و با بالا رفتن سن گیاه خاکستری رنگ می شود و پوسته آن ترک می خورد. برگهای درخت، نازک و معطر و دارای گل‌های نر خوشه‌ای و گل‌های ماده غنچه‌ای است. موطن اصلی آن غرب آسیا و جنوب شرقی اروپا است (۴۰، ۴۱، ۴۹). برگ و پوسته گیاه دارای تانن، ژوگلانین^۱، تانن‌های گالیک، اسانسهای روغنی و یک گلیکوزید به نام هیدروژوگون^۲ می باشد. تانن تلخ موجود در برگ و پوست گردو در مداوای بیماریهای جلدی و خنازیر مفید است. بیشترین میزان ماده تشکیل دهنده میوه گیاه، چربی است. لینولئیک اسید، بیشترین اسید چرب موجود در گردو بوده و بعد از آن اسید اولئیک، لینولنیک اسید و پالمیتیک اسید قرار دارند (۴۱، ۵۰). خواص درمانی دیگر گیاه، خواص

¹ Juglanine²Hydrojuglone

ضدالتهابی بر روی مخاطها، گندزدایی، تقویت کننده عمومی و دفع کننده کرمهای انگلی می باشد.

قسمتهای دارویی آن، برگچه های خشک و پوست میوه تازه آن می باشد (۴۳، ۴۲).

بهمنی و همکاران در سال ۲۰۱۲ برای بررسی سمیت عصاره متانولی گردو، دوز ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم عصاره مذکور را به مدت ۷۲۰ دقیقه با زالو مجاورت دادند. داروهای نیکلوزامید، پی پرازین، کلروکین، پرازی کوانتل به عنوان کنترل مثبت و سرم فیزیولوژی به عنوان کنترل منفی در این آزمایش استفاده شدند. میزان کشندگی داروی نیکلوزامید برای زالو ۴+ و برای عصاره گردو صفر بود و این عصاره هیچ اثر ضد کرمی نداشت (۵۱).

Wang و همکاران اثر حشره کشی عصاره های پترولیوم اتری، کلروفورمی و متانولی پوست سبز گردو را بر روی کنه *Tetranychus cinnabarinus* مورد مطالعه قرار دادند و مشخص کردند که اثر عصاره پترولیوم اتری آن در مقایسه با دو عصاره دیگر بیشتر بود (۵۲).

در سال ۱۳۸۹ خلیلی دهکردی و همکاران اثر چند عصاره گیاهی از جمله برگ گردو را روی تریکوموناس واژینالیز بررسی کردند. آنها غلظتهای ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ mg/ml آنها غلظتهای ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ از عصاره مذکور را با تک یاخته فوق برای مدت زمانهای ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در محیط کشت در ۳۷ ° سانتی گراد انکوبه کردند. محیط شاهد این مطالعه فقط حاوی انگل بود. برای گروه آزمایش، میانگین تعداد انگل های زنده بعد از مواجهه با عصاره اتانولی برگ گردو برای مدت زمانهای ۶، ۲۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۷/۱۰۰، ۳/۹۲، ۷۹، ۳/۶۴ عدد و برای گروه شاهد (بدون عصاره گیاه) ۱۵۰ انگل بود. عصاره گیاه مذکور در غلظتهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و

۸۰۰ باعث کاهش معنی دار تعداد انگل ها نسبت به محیط شاهد شد. میزان اثر عصاره کشندگی با

افزایش غلظت و مدت زمان مواجهه افزایش یافت (۵۳).

افسنطین (*Artemisia absinthium*)



افسنطین از خانواده کاسنی (Asteraceae) بوده و شامل ۵۰۰ گونه می باشد. گیاه مذکور با نامهای انگلیسی دیگری مثل *wormwood* و *mugwort* و نامهای فارسی مثل درمنه، دسیسه، افسنتین و کشوشاروی نیز شناخته می شود (۴۰، ۳۹). گیاهی علفی و پایا به ارتفاع ۶۰-۴۰ سانتی متر بوده که گاهی تا ۱۰۰ سانتی متر نیز می رسد. درختچه ای با شاخه های گسترده، پر از برگهای خطی که در قسمت انتهایی شاخه ها، گلهای زردی از بغل برگها می رویند. سطح فوقانی برگ ها، ساقه ها و انشعابات آنها پوشیده از تارهای فراوان است. درانتهای ساقه، خوشه گلی به رنگ زرد وجود دارد. میوه آن فندقه بسیار کوچک و دارای سطح صاف است و از تمام قسمتهای آن بوی تندی استشمام می شود. از این عطر برای معطر ساختن منازل و بر علیه بید زدگی استفاده می شود. موطن اصلی ای گیاه اروپا، آسیا، آفریقا است و درایران نیز دراطراف دماوند، آستارا و سواحل دریای خزر می روید.

این گیاه معمولاً در آب و هوای معتدل شمالی رشد می کند. سرشاخه های گیاه مذکور مصارف دارویی داشته و عمدتاً در درمان مالاریا، هپاتیت، سرطانها، التهابها و عفونتهای قارچی به کار می رود. اسانس این گیاه فرااست و با بوی قوی حاصل از متابولیت ثانویه قابل تشخیص است. ترکیبات شیمیایی گونه های *Artemisia* متفاوت بوده و دارای موادی از قبیل اسانسهای روغنی، عصاره تلخ تانن و آلکالوئید است که در طب سنتی، در درمان سوء هاضمه و دفع کرمهای روده ای استفاده می شود (۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۳، ۵۴). ابسینتین^۱ که نخستین بار توسط Duquencel کشف شد ماده دیگری از ترکیبات گیاه است که بعد از تبلور به انابسنتین^۲ تبدیل می شود. ماده اصلی اسانس افسنطین، تویون^۳ است که به همراه تویول^۴ و کاردینن در آن یافت می شود (۳۸). از ترکیبات دیگری که در *A. absinthium* یافت می شود می توان به کامفور^۵، کامازولین^۶، بتا میرسین^۷، بتا پاین^۸، ترنس سابینیل استات^۹ و بتا توجن^{۱۰} اشاره کرد که ترکیب اخیر خاصیت روانگردان دارد (۵۴). (۵۴). هر یک از ترکیبات موجود در این گیاه خواص مخصوص به خود را دارد. به طور مثال ترکیباتی مثل سسکوئیترپن ها^{۱۱}، کومارینها و پلی متوکسی فلاونها و آرتیمیسینین^{۱۲} ترکیبات ضد مالاریای افسنطین هستند. اگرچه بیشترین مقدار آرتیمیسینین در دو گونه *A. apiacea* و *A. lancea* یافت شده ولی در گونه های دیگر نیز دیده شده است. از دیگر ترکیبات ضد مالاریایی که در این گیاه مشاهده شده می توان به 1(s)-hydroxy-a-bisaboloxide A acetate و

¹ Absinthin

² Anabsinthin

³ Thuyon

⁴ Thuyol

⁵ Camphor

⁶ Chamazulene

⁷ β -myrcene

⁸ β -pinene

⁹ Trans-sabinyl acetate

¹⁰ β -thujone

¹¹ Sesquiterpenes

¹² Artemisinin

isofraxidin اشاره کرد. همچنین خواص ایمنی زایی و سایتو توکسیک در گیاه مذکور را به وجود

ترکیباتی از قبیل پلی ساکارید ها، پروتئین ها، ترپنوئیدها و فلاونوئیدها نسبت داده اند (۵۵).

دریک مطالعه مروری که توسط Hammond و همکاران در اسکاتلند روی چند گیاه از جمله

افسنطین انجام شد مشخص گردید که خواص ضد کرمی گیاه مذکور مربوط به ماده

chuanliansu می باشد (۴۴).

در مطالعه ای که در سال ۱۳۹۰ توسط رستمی و همکاران انجام گرفت تاثیر عصاره درمنه کوهی

(*Artemisia*) بر موشهای BALB/c آلوده شده با لیشمانیا ماژور مورد بررسی قرار گرفت.

غلظتهای مورد مطالعه mg/kg ۰/۰۹، ۰/۳۶، ۱/۴۴ و ۶ بود. نتایج نشان داد که غلظتهای

۱/۴۴ و ۶ mg/kg کاهش معنی داری در اندازه قطر زخمها ایجاد کردند. همچنین عصاره مذکور

باعث کاهش معنی داری در بزرگی کبد، طحال، غدد لنفاوی و کاهش بار انگلی داخل ماکروفاژها شد

(۵۶).

در سال ۲۰۰۷ درهند Sen و همکارانش مطالعه ای با هدف بررسی عملکرد آرتیمیسینین (موجود در

گیاه درمنه کوهی) در متوقف کردن چرخه زندگی انگل لیشمانیا دونووانی انجام داده و انگل ها برای

مدت ۲۴ ساعت در مجاورت با آرتیمیسینین کشت داده شدند. این ترکیب با غلظت $160 \mu M$ توانست

۵۰٪ درصد پروماستیگوتها و در غلظت $22 \mu M$ ، ۵۰٪ آماستیگوتها را از بین ببرد (۵۷).

در ترکیه Caner و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر دو گونه از گیاه افسنطین (*Artemisia vulgaris* و

Artemisia absinthium) را بر روی تریشینلا اسپیرالیس در رات بررسی نمودند. رات های

مورد آزمایش به طور تجربی با انگل آلوده شده و به مدت ۵ روز به میزان ۳۰۰ و ۶۰۰ mg/kg

عصاره متانولی گیاهان مذکور به آنها داده شد. نتیجه مطالعه نشان داد که عصاره مذکور در دوز بالا (600 mg/kg) تاثیر بیشتری داشت و توانست بیشتر از غلظت 300mg/kg، از ایجاد لارو در عضلات جلوگیری کند (58).

در یک مطالعه مروری که توسط Edris در سال 2007 انجام شد، اثرات چند گیاه دارویی از جمله افسنتین بررسی گردید. در این مطالعه عنوان شد که اسانس یکی از گونه های درمنه (*Artemisia arborescens*) می تواند فعالیت ضد ویروسی بر علیه ویروس تبخال نوع 1 (HSV-1) داشته باشد (59).

در آلمان در سال 2009، Nibret و همکارش اثر دی کلرومتان عصاره 4 گونه از درمنه کوهی (*Artemisia absinthium*, *A. abyssinica*, *A. afra*, *A. annua*) را بر روی تریپانوزوما بروستی بررسی کردند. غلظتهای مورد استفاده آنها 250 mg/ml - 3/91 بودند و انگل ها به مدت 48 ساعت به همراه عصاره ها کشت داده شدند. غلظت های 19/13 µg/ml از عصاره گیاه *Artemisia abyssinica* 35/91 µg/ml از عصاره *Artemisia annua* و غلظتهای کمتر از 50 µg/ml *Artemisia absinthium* توانستند 50 درصد از انگل ها را از بین ببرند (60).

در سال 2012 Perez و همکارانش درمکزیک در یک مقاله مروری اثر عصاره های 24 گونه گیاهی از جمله افسنتین را روی تک یاخته ها مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند اسانس گونه ای از افسنتین (*Artemisia abrotanum*)، پتانسیل ضد لیشمانیایی بر علیه لیشمانیا آمازونن سیس

دارد. اسانس این گیاه با غلظتهای $3/7 \mu\text{g/ml}$ و $4/6$ به ترتیب 50% از پروماستیگوت ها و آماسیتیگوت ها را از بین برد (۶۱).

مطالعه ای توسط Doroodgar و همکاران درایران (سال ۲۰۰۸) انجام شد و اثر اسانس هیدرو الکلی گونه *Artemisia sieberi* با غلظتهای ۱، ۳ و 5% را روی لیشمانیوز جلدی در موش های BALB/c مورد بررسی قرار دادند. نتیجه مطالعه مشخص کرد، غلظتهای 3% و 5% این اسانس می توانند کاهش معنی داری در قطر زخم ها نسبت به گروه کنترل (اتانول 80%) ایجاد کنند (۶۲).

در سال ۱۳۸۹ خلیلی دهکردی و همکاران با هدف بررسی چند عصاره گیاهی از جمله افسنتین، بر روی انگل تریکوموناس واژینالیس مطالعه ای انجام دادند. در این تحقیق غلظتهای $3/12 \text{ mg/ml}$ ، $6/25$ ، $12/5$ ، 25 ، 50 ، 100 ، 200 ، 400 و 800 عصاره گیاه مذکور با انگل فوق مجاورت داده شد و در مدت زمانهای ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان تحرک و زنده ماندن انگل ها بررسی گردید. گیاه مورد آزمایش در تمام غلظتها به جز $3/12 \text{ mg/ml}$ نسبت به محیط شاهد (بدون عصاره)، کاهش معنی داری در تعداد انگل های زنده ایجاد کرد ($P < 0/05$) (۵۳).

Bao و همکاران در سال ۲۰۱۳، پلی ساکارید محلول در آب (FAAP-02) جدا شده از گونه ای افسنتین (*Artemisia argyi*) را بر روی سلول های توموری سارکوما در موش بررسی کردند. این پلی ساکارید در دوزهای 50 mg/kg/day ، 100 و 200 به مدت ۷ روز به موش تزریق شد. درصد ممانعت از رشد تومور در دوزهای 50 mg/kg/day ، 100 و 200 به ترتیب $1/35 \pm 28/37$ ، $30/58 \pm 0/76$ و $38/58 \pm 2/53$ درصد بود که روند افزایش وابسته به دوز را نشان داد. به علاوه اندازه گیری میزان IL2، IL6، IL12 و $\text{TNF-}\alpha$ در سرم موش، با روش الیزا مشخص کرد که این

پلی ساکارید مارکرهای فوق را افزایش داده است. همینطور اندازگیری لنفوسیت های موش با روش فلوسایتومتری نشان داد که پلی ساکارید مذکور، لنفوسیت های T دارای مارکرهای CD4+ و CD8+ را که توسط تومور مهار شده بودند را در طحال افزایش داد. نتیجه این مطالعه خواص ایمنومدولاتوری این پروتئین در گیاه را تأیید کرد (۷۸).

Attard و همکارش در سال ۲۰۰۹ مطالعه ای روی اثر ۱۰ گونه گیاه متعلق به خانواده کاسنی بر لنفوسیت های T خون محیطی انسان در محیط آزمایشگاه انجام دادند. ۵ عصاره مختلف آبی، اتانولی، آبی-الکلی، کلروفرمی و پترولیوم اتری از این گیاهان تهیه شد و برای بررسی اثر ایمنومدولاتوری عصاره ها، لنفوسیت ها در مجاورت غلظتهای $10 \mu\text{g/ml}$ ، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ این عصاره ها کشت داده شدند. در بررسی ۵۰ عصاره تهیه شده ۷۶٪ آنها دارای ترکیبات فلاونوئید، ۵۶٪ ترپنوئید، ۵۴٪ پروتئین و ۱۶٪ دارای آلکالوئید بودند. نتایج بررسی اثرات ایمنومدولاتوری گیاهان با روش WST-1 نشان داد، از بین ۵۰ عصاره آزمایش شده، ۶ عصاره، اثر ایمنومدولاتوری دارند و فعال ترین آنها، عصاره پترولیوم اتری کالاندولا بود که احتمال داده شد به دلیل وجود فلاونوئید های موجود در عصاره باشد (۷۹).

در سال ۲۰۰۹ در کشور کره، Kim و همکاران اثر ایمنومدولاتوری عصاره متانولی *Artemisia capillaris* را بر ضد سلول های Hepa-1c1c7 و سلول های سرطانی Sarcoma 180 در موشهای نژاد ICR 210 بررسی کردند. نتایج بررسی های فلوسایتومتری این تحقیق نشان داد که عصاره گیاه مورد آزمایش میزان مارکرهای CD3+, CD4+, CD8+ و TNF- α + در سلول های طحال را به طور معنی داری کاهش داد. این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی

Artemisia capillaries ، دارای اثر ضد توموری بر روی سلول های رده Hepa-1c1c7 و

Hepa-1c1c7 می باشد (۸۰).

رازیانه (*Foeniculum vulgare*)



گیاهی از خانواده چتریان (Apiaceae) بوده و با نام های دیگری از جمله رازیانچ و نام عربی شمر نیز شناخته می شود. دارای ۲ واریته به نام های رازیانه تلخ و رازیانه شیرین یا فلورانسی است. نام *Foeniculum* توسط رومی ها به این گیاه داده شده و از لغت *foenum* به معنی یونجه گرفته شده که احتمالاً به دلیل بوی خاص این گیاه باشد. رازیانه گیاهی ۲ ساله بوده و در اثر کشت مداوم به تدریج حالت خودرو یا نیمه وحشی پیدا می کند. ارتفاع گیاه تا ۲ متر می رسد و دارای ریشه دوکی شکل، بزرگ و ۲ شاخه است. گلها درون گل آذین به شکل چتر مرکب قرار دارند. جام گل دارای ۵ گلبرگ زرد رنگ است. میوه آن تخم مرغی شکل بوده و دارای رگه های برجسته طولی است. ظاهر گیاه شبیه شوید بوده ولی بوی مطبوع، ساقه مرتفع و ریشه ضخیم آن، گیاه را از شوید

متمایز می سازد. موطن اصلی آن نواحی مدیترانه و قفقاز است. در نواحی مدیترانه، اروپا، آسیا و همین طور ایران گستردگی دارد. محل رویش آن در ایران نواحی مختلف البرز می باشد.

ترکیبات شیمیایی رازیانه شامل روغنی فرار حاوی آنتول، فنون، استراکول، کامفر، آلفا فلاندرن^۱، متیل اوژنول، آلدئید و استون آنیزیک، کامفن، دیپانتین و فیتواستروژن می باشد. مقدار مواد شیمیایی گیاه بر حسب محل رویش متفاوت است. تحقیقات مشخص کرده اند که بعضی از این ترکیبات مانند دی- لیمونن^۲ و دی- کاروون^۳ اثر ضد قارچی قوی دارند. دانه رازیانه خواص اشتها آوری، التیام بخشی زخم معده، دافع کرم، ضد اسپاسم و ضد انگل های روده ای دارد (۴۱-۳۸).

Conti و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر حشره کشی اسانس روغنی چند گونه گیاهی از جمله رازیانه را در مقابل لارو پشه آئدس آلبوپیکتوس بررسی نمودند. میزان ترکیبات اسانس گیاه با روش کروماتوگرافی گازی قبل از شروع آزمایش تعیین شد. از گیاه مذکور ترکیبات مهمی چون آلفا پینن ۴/۲٪، میرسن ۴/۲٪، آلفا فلاندرن ۱۶٪، لیمونن ۲/۷٪، بتا فلاندرن ۲/۴٪، فنکن ۱۱/۸٪، کامفر ۰/۵٪ و بسیاری مواد دیگر آنالیز شده است. اسانس گیاه مذکور با غلظت های ۵۰ppm، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ در آب معدنی و ۰/۰۱ درصد در توئین ۸۰ تهیه و لاروها به مدت ۲۴ ساعت با آنها مورد مواجهه قرار گرفتند. اثر کشندگی گیاه رازیانه در غلظت های ۵۰ppm، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ تا ۳۰۰ به ترتیب ۵، ۳۳/۳، ۴۸/۳، ۹۶/۷، ۹۸/۳ و ۱۰۰ درصد گزارش شد و در غلظت ۲۰۰ppm تا ۳۰۰ باعث از بین رفتن ۱۰۰-۹۸/۳٪ از لاروها گردید. طی آزمایش مشاهده شد که شدت مرگ و میر لاروها کاملاً وابسته به غلظت اسانس بود (۶۳).

^۱ α-phellanderen

^۲ D- limonene

^۳ D-carvone

نائینی و همکاران طی یک مطالعه، اثرات ضد کاندیدایی اسانس و عصاره ۵۰ گیاه دارویی از جمله رازیانه را روی سویه ی استاندارد کاندیدا آلبیکنس با استفاده از روش دیسک گذاری و انتشار در آگار، مورد بررسی قرار دادند. آنها از داروهای آمفوتریسین B، کتوکونازول و نیستاتین به عنوان کنترل مثبت استفاده کردند و تشکیل منطقه عدم رشد قارچ در پیرامون دیسک ها را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که ۱۶ گیاه از ۵۰ گیاه مورد مطالعه، دارای فعالیت ضد کاندیدایی بود. قطر هاله عدم رشد در مقابل داروهای ضد قارچ مورد استفاده از جمله آمفوتریسین B، کتوکونازول و نیستاتین به ترتیب ۱۶ mm، ۲۳ و ۲۵ به دست آمد. قطر هاله عدم رشد رازیانه ۲۵ mm و اثر اسانس گیاه رازیانه متوسط گزارش شد. (هاله عدم رشد بین ۲۵mm - ۲۰، متوسط در نظر گرفته شد) (۶۴).

رنجبریان و همکاران در سال ۱۳۷۳، اثر ضد باکتریایی چند گیاه از جمله رازیانه را بر روی ۱۴ سویه هلیکوباکتر پیلوری به روش دیسک دیفیوژن بررسی نمودند. عصاره ها با غلظت های ۰/۰۱ g/ml، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ تهیه و به دیسک ها تلقیح گردید. عصاره های مورد نظر با سوسپانسیون باکتری ها در محیط کشت مولر هیتون آگار خون دار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳-۴ روز اینکوبه شدند. از ۱۴ سویه هلیکوباکتر پیلوری، ۹ سویه به عصاره رازیانه حساسیت نشان دادند. قطر هاله مربوط به مهار رشد باکتری توسط گیاهان بین ۱۲-۸ میلی متر گزارش گردید (۶۵).

Sharififar و همکاران مطالعه ای روی اثر ایمنومدولاتوری عصاره آبی گیاه گلپر (*Heracleum persicum*) از خانواده چتریان انجام دادند. این عصاره روی موشهای ماده Swiss albino در مقادیر ۵۰mg/kg/day، ۱۰۰ و ۲۰۰، به ازای هر کیلو وزن موش، برای ۵ روز

آزمایش شد. وزن ارگان های کبد، طحال و کلیه، افزایش حساسیت تاخیری و تیتراهماگلوتیناسیون در گروههای مختلف حیوانات آزمایش شد. عصاره گیاه مذکور در غلظتهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg باعث افزایش وزن طحال، در سه غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg/day باعث افزایش وزن کبد و در غلظت ۲۰۰ mg/kg/day باعث افزایش وزن کلیه شد. نتیجه تست هماگلوتیناسیون عصاره گیاه نشان داد که این گیاه در تمام غلظتها اثر محرک دارد و نتایج تست افزایش حساسیت تاخیری در مقایسه با دگزامتازون افزایش معنی داری برای غلظتهای mg/kg/day ۱۰۰ و ۲۰۰ نشان داد. این عصاره ایمنی سلولی و همورال را در موش افزایش داد (۸۱).

در مطالعه karimi و همکاران خواص گیاه جعفری از خانواده چتریان مورد بررسی قرار گرفت. محققین غلظتهای ۱۰۰-۰/۰۱ µg/ml اسانس جعفری را روی سلول های طحالی تحریک شده با فیتوهماگلوتنین^۱ (لنفوسیت های T) و لنفوسیت های B تحریک شده با LPS^۲ آزمایش کردند. علاوه بر آن، ماکروفاژهای تحریک نشده و ماکروفاژهای تحریک شده با LPS را برای سنجش میزان نیتریک اکساید مورد مطالعه قرار دادند. میزان این ماده با روش Griess آزمایش شد. اسانس جعفری در تمام غلظتها باعث سرکوب تکثیر سلول های طحال تحریک شده با فیتوهم آگلوتنین و همچنین سلول های طحالی مواجه نشده با LPS شد و در غلظتهای بالاتر (۱۰۰، ۱۰ µg/ml) این اسانس توانست تولید نیتریک اکساید از ماکروفاژها را مهار کند. محققین احتمال دادند که این اثر ایمنومدولاتوری ممکن است به دلیل سایتوکاینهایی مثل IFN-γ و IL-2 که برای تکثیر لنفوسیت های T حیاتی هستند باشد (۸۲).

^۱ Phytohemagglutinin (PHA)-stimulated

^۲ Lipo poly sacarid

بومادران (*Achillea millefolium*)



بومادران گیاهی از خانواده کاسنیان (Compositae) بوده و با نام های عربی حزنبل (hazanbal) و ام الف ورقه نیز شناخته می شود (۳۸). گیاهی علفی و ریزوم دار با ساقه مستقیم بوده و ارتفاع آن به یک متر می رسد. برگهای گیاه، شانه ای شکل و به رنگ سبز تیره با برش های ظریف می باشد. سطح زیرین برگها کرک دار بوده و طول برگ آنها به ۵-۲ سانتی متر می رسد ولی بیش از ۲۰ سانتی متر هم گزارش شده است. عرض برگها بین ۴-۱ سانتی متر بوده و از نهج یا فلسهای کوچک پوشیده شده است. از کلیه قسمتهای گیاه بوی شدید و مخصوصی استشمام می شود. قسمتهای قابل استفاده گیاه، اندامهای جوان شاخه ها، برگها و گلها ست. رویش این گیاه از نواحی مختلف اروپا و ایران گزارش شده است (۳۸، ۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۳). این گیاه شامل ترکیباتی از قبیل

پلی فنول، انواع فلاونها، بتائینها، ترکیبات استیلن، رزین، تانن، آشیلن، نوعی گلوکوزید تلخ، فسفات، نیترات، نمکهای پتاسیم و اسیدهای آلی پروکامازولن^۱، آلفا و بتاپینن، سینثول، لیمونن، بورنتول، استات بورنتول، کامفور، لاکتونها، سزکویی ترپن و فلاونوئیدها می باشد. آشیلن ماده ای به صورت گرد زرد رنگ مایل به قهوه ای است که بویی مخصوص و تلخ دارد به مقدار کم در اتر و الکل و به مقدار زیاد در آب حل می شود. از خواص درمانی آن می شود به خواص قابض بودن، ضد اسپاسم، مسکن دردهای رحمی، صفرا آور و منظم کننده قاعدگی، بند آورنده خون ریزی، مدر بودن و دافع کرم اشاره نمود. در قدیم برای درمان بعضی بیماریهای گوارشی از آن استفاده می کردند. اسانس بومادران خاصیت ضد باکتریایی و ضد تورم و التیام بخش نیز دارد (۳۸، ۴۰، ۴۳).

در سال ۱۳۸۹ خلیلی دهکردی و همکاران اثر چند عصاره گیاهی از جمله بومادران را روی تریکوموناس واژینالیس بررسی کردند. آنها غلظتهای ۳/۱۲-۸۰۰ mg/ml از عصاره گیاه را در محیط کشت با تک یاخته مذکور برای مدت زمانهای ۶-۷۲ ساعت در ۳۷ ° سانتی گراد انکوبه کردند. محیط گروه شاهد در این مطالعه فقط حاوی انگل بود. میانگین اثر کشندگی عصاره بومادران برای تریکوموناس واژینالیس در مدت زمانهای ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۱۴/۲، ۹۳/۲، ۷۶/۶، ۵۵/۷ و برای گروه شاهد ۱۵۰ انگل بود. تمام غلظتهای عصاره گیاه مذکور بر روی تریکوموناس موثر بوده و باعث کاهش تعداد انگل ها شد. میانگین تعداد انگل های زنده در محیط کشت برای مدت زمانهای ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۱۴/۲، ۹۳/۲، ۷۶/۵، ۵۵/۷ انگل و برای گروه شاهد ۲۰۶/۷ انگل بود. تاثیر تمام غلظتها به جز ۳/۱ mg/ml، ۶/۲۵، ۱۲/۵ در مقابل گروه شاهد معنی دار بود. میزان اثر عصاره کشندگی با افزایش غلظت و مدت زمان مواجهه افزایش داشت (۵۳).

^۱ Prochamazulene

حجازی و همکاران برای مقایسه اثر بخشی عصاره هیدروالکلی چند گیاه از جمله بومادران بر ضایعات جلدی لیشمانیا ماژور در موش های BALB/c، مطالعه ای انجام دادند. قطر زخم لیشمانیوز جلدی موش ها پیش از استفاده از بومادران $0.5 \pm 4/35$ میلی متر و پس از ۳ هفته استفاده از عصاره مذکور $0.67 \pm 3/4$ میلی متر بود. این عصاره کاهش معنی داری در قطر زخم ایجاد کرد (۶۶).

ایزدی و همکاران اثر عصاره آبی بومادران در غلظتهای mg/dl ۱/۳، ۲/۶، ۴، ۵/۶، ۶/۶، ۸، ۹/۳، ۱۰/۶، ۱۲، ۱۳/۳ و ۲۰ و اسانس بومادران در غلظت های mg/dl ۰/۰۵ و ۰/۰۶ را بر روی عفونت حاصله از اکسیور در موشهای BALB/c را بررسی کردند. موش ها در ۴ گروه تحت تجویز عصاره آبی، عصاره تغلیظ شده، اسانس و یک گروه شاهد (۵ mg/ml پیرونیوم و پاموات) قرار گرفتند. عصاره و اسانس مذکور برای مدت زمان ۵ روز به موش های آلوده به انگل اکسیور خورانده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره بومادران در غلظت ۲۰ mg/dl در مدت زمانهای ۲۴-۱ ساعت در شرایط آزمایشگاهی باعث غیر فعال شدن کرمهای اکسیور شد ولی تاثیری بر عفونت زایی تخم نداشت همچنین، نتایج آزمایش در موش های دریافت کننده عصاره و اسانس گیاه بومادران، اثر قطعی این عصاره ها در کاهش دفع کرم در مدفوع موش را نشان داد. با افزایش غلظت عصاره و اسانس ها میزان تاثیر آنها بر انگل افزایش یافت و این تاثیر احتمالاً به دلیل وجود ترکیب کومارین در اسانس و عصاره این گیاه باشد (۶۷).

Jonsdottir و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی عصاره آبی دو گیاه از جمله بومادران روی بلوغ سلول های دندریتیک انسان و تاثیر آن روی لنفوسیت های $CD4^+$ T مطالعه ای انجام دادند. بلوغ سلول های دندریتیک با روش فلوسایتومتری و میزان سایتوکاین ها با روش الایزا اندازه گیری شد.

سلول های دندریتیک در مجاورت عصاره آبی بومادران کشت داده شده و به بلوغ رسیدند. این عصاره ها تاثیری در بلوغ این سلول ها نداشتند ولی باعث کاهش دو مارکر IL-12p40 و IL-10 در سلول های دندریتیک شدند. همچنین عصاره بومادران باعث کاهش ترشح IL-17 شد ولی تاثیری در ترشح IL-10 و IFN- γ از لنفوسیت های T نداشت. نتیجه این مطالعه نشان داد عصاره آبی بومادران توانایی سلول های دندریتیک در تحریک پاسخ های TH₁₇ را کاهش می دهد (۸۳).

اکالیپتوس (*Eucalyptus globoulus*)



از خانواده مورد ها (Myrtaceae) بوده و با نامهای دیگری نظیر آلك و نام عربى شجره الكافور نیز شناخته مى شود (۴۲، ۴۳). دارای ۶۰۰ گونه است که نزدیک به ۵۰ گونه آن در سواحل مدیترانه رشد مى کند. درختی بزرگ با تنه ای صاف است که پوست آن به آسانی ورقه ورقه مى شود و مى افتد. رنگ برگهای جوان، آبی مایل به خاکستری است و با برگهای بالغ متفاوت مى باشد. برگهای جوان مقابل هم مى رویند و دمبرگ محکم ندارند ولی برگهای بالغ که روی انشعابات مسن تر قرار دارند، متناوب و دارای دمبرگ محکمی مى باشند. این برگها داسی شکلند و قانده نامتقارن دارند. گلها دارای تعداد زیادی پرچم، فاقد گلبرگ و دارای کاسبرگ استکانی شکل مى باشند. کاسبرگ گل دارای ۴ رگه ضخیم بوده و توسط غشایی در برگرفته مى شود و هنگام توسعه گل، مانند درپوشی مى افتد. میوه آن دارای کپسول چرم مانند مشخص بوده و حاوی تعداد زیادی دانه مى باشد. این گیاه بومی استرالیا است ولی از یک قرن پیش وارد ایران شده و در مازندران و نقاط دیگر کشور کاشته

در مطالعه بهادری و همکارش در سال ۱۳۹۱، اثر چند گیاه از جمله اکالیپتوس در کنترل جرب قرمز (درمانیسوس گالینه) طیور بررسی شدند. در این بررسی عصاره اکالیپتوس به میزان 63 mg/cm^3 به قفس پرندگان آلوده به مایت اسپری شد و یک قفس بدون اسپری با عصاره به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. تعداد مایتها ۱ و ۷ روز پس از آزمایش شمارش شدند. میزان اثر بخشی عصاره اکالیپتوس در روزهای اول و هفتم پس از انجام درمان به ترتیب $85/80\%$ و $14/58\%$ بود و اثرش در مقایسه با گروه شاهد و عصاره های دیگر معنی دار بود. از بین عصاره های مورد آزمایش فقط اکالیپتوس دارای اثر طولی المدت بود (۶۹).

صفرنژاد و همکاران تاثیر غلظتهای 10 ، 100 ، 200 mg/ml عصاره متانولی چند گیاه از جمله اکالیپتوس را بر روی کیست ژیا ردیا لامبلیا بررسی کردند. کیستهای انگل به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه در مجاورت عصاره مذکور قرار گرفته و کیستهای مرده پس از این مدت زمان شمارش شدند. غلظتهای 10 mg/ml و 200 در ۳۰ دقیقه به ترتیب 45% و 59% از انگل ها را از بین بردند (۷۰).

در سال ۲۰۱۲ Yoshimura و همکاران در ژاپن، تاثیر ترکیب Oenothrin B را که در چند خانواده از گیاهان از جمله موردها یافت می شود، روی سلول های دندریتیک بررسی کردند. در این بررسی محققین اثر ترکیب فوق با غلظتهای 25 و $100 \mu\text{M}$ را با EGCG، که شرایط آپوپتوز به سلول مورد نظر را القا می کرد، با کمک فلوسایتومتری آزمایش نمودند. Oenothrin B در غلظت $100 \mu\text{M}$ توانست آپوپتوز را به سلول دندریتیک القا کند در صورتی که همین غلظت از EGCG نتوانست بیشتر از کنترل، باعث القای آپوپتوز شود. ترکیب مذکور در غلظت $100 \mu\text{M}$ تغییر معنی داری در میزان CD86 ایجاد نکرد ولی CD83 و CD1a را کاهش داد. اندازه گیری سایتوکاین های

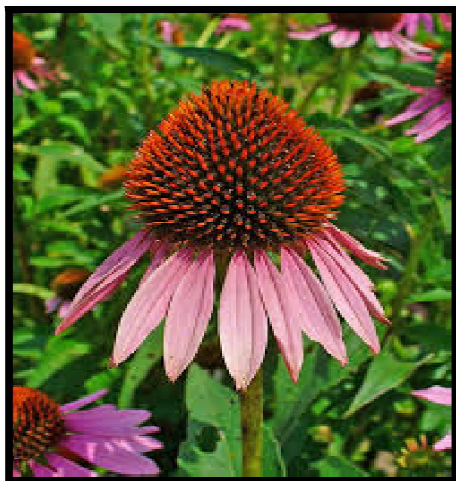
، G-CSF، IL 17، IL 13، IL 12، IL 10، IL 8، IL 7، IL 6، IL 5، IL 4، IL 2، IL-1 β

GM-CSF، IFN- γ ، MCP-1، MIP-1 و TNF- α نشان داد که ترکیب فوق می تواند بیان این

مولکولها را در سطح سلول کاهش دهد. نتایج مطالعه نشان داد Oenothien B که یک نوع تانن

است، می تواند اثرات ضد التهابی داشته باشد (۸۴).

سرخارگل (*Echinacea purpurea*)



سرخارگل با نام علمی *Echinacea* دارای ۹ گونه است که گونه های *E. pallid* ، *E. purpurea* و *E. angustifolia* دارای خواص درمانی می باشند. این گیاه از تیره Asteraceae بوده و در زبان انگلیسی با نامهای *Echinacea* و *coneflower* شناخته می شود. این گیاه در شرق و مرکز آمریکا به صورت خودرو می روید و در اروپا کشت می شود. اولین بار در سال ۱۳۷۲ توسط دکتر رضا امید بیگی به ایران آورده شد و توسط آقای دکتر سید محمد فخر طباطبایی سرخارگل نامیده شد. کشت این گیاه در مناطق شمالی کشور رایج است. طول گیاه بین ۶۰-۴۰ سانتی متر بوده و دارای ساقه ای راست و برگهای متقابل تخم مرغی شکل یا نوک تیز می باشد. گلها به صورت منفرد در انتهای ساقه رشد می کنند. غنچه ها بزرگ و گلها به هر دو صورت شعاعی و صفحه ای قرار می گیرند. رشد ریشه ها به صورت عمودی یا افقی است (۳۸،۷۱،۷۲).

مواد شیمیایی موجود در گیاه شامل بخشهای لیپوفیلیک، پلی ساکاریدهای محلول در آب، مشتقات اسید کافئیک (مثل اسید شیکوریک)^۱ و فلاونوئیدها می باشد. اولین ترکیب منحصر به فرد گیاه، اکیناکوزید از مشتقات اسید کافئیک بوده که به یک مولکول گلوکز مرکزی متصل می باشد. بیشترین مقدار اکیناکوزید در ریشه گیاه دیده بوده اما به میزان کمتر در گلها نیز وجود دارد. از مشتقات دیگر اسید کافئیک که دارای خاصیت فارماکولوژیک است، اسید شیکوریک، اسید کلوروژنیک و سینارین می باشد. پلی ساکاریدها و اسید شیکوریک اثر تحریکی روی سیستم ایمنی دارند. لازم به ذکر است که اکیناکوزید ها که برای استاندارد کردن عصاره های *E. pallida* و *E. angustifolia* استفاده می شوند در *E. purpurea* وجود ندارند. ترکیب شیمیایی و فعالیت بیولوژیک عصاره و اسانس گیاه به عواملی از جمله گونه گیاه، بخش مورد استفاده آن (ریشه و بخشهای هوایی)، روش عصاره گیری، موقعیت جغرافیایی، مرحله تکامل، زمان برداشت و شرایط رشد گیاه بستگی دارد. ترکیبات شیمیایی ریشه در مقایسه با بخشهای هوایی متفاوت است. به طور مثال ریشه گیاه، روغنهای فرار و آلکالوئیدهای پیرولیزدین مانند توسیلاگین^۲ و ایزو توسیلاگین^۳ زیادهتری نسبت به بخشهای هوایی آن دارد. در بخشهای هوایی این گیاه مشتقات اسید کافئیک و فرولیک (مثل اسید شیکوریک و اکیناکوزید) و پلی ساکاریدهای پیچیده ای مثل اسیدیک آرابینوگالاکتان^۴، رامنوآرابینوگالاکتان^۵ و متیل گلوکورونیل آرابینوگزیران^۶ وجود دارد (۷۱).

¹ Chichoric acid

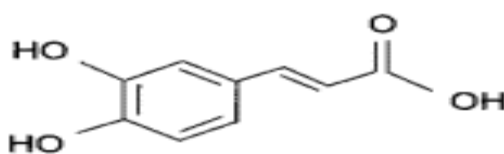
² Tussilagine

³ Isotussilagine

⁴ Acidic arabinogalactan

⁵ Rhamnoarabinogalactan

⁶ Methylglucuronyl-arabinoxylan



اسید کافئیک

سرخارگل از اوایل قرن هفدهم میلادی توسط بومیان آمریکا برای درمان امراضی از جمله بیماریهای لثه و دهان، سرماخوردگی، سرفه، مارگزیدگی، مسمومیت خونی، گلودرد، درد معده و روده استفاده می شد. در طول قرن نوزدهم میلادی این گیاه بیشترین تجویز توسط پزشکان سنتی و تجربی را داشت. خواص بهبود دهنده و ضد عفونی کننده زخم این گیاه در سال ۱۹۴۰ تأیید و در فهرست ملی گیاهان دارویی ایالات متحده قرار گرفت. در دهه های اخیر این گیاه دوباره مورد توجه قرار گرفته به طوری که در آمریکا سالانه ۳۰۰ میلیون دلار از این گیاه به فروش می رسد که عمده مصرف آن در درمان آنفولانزا و سرماخوردگی است. پمادهای تهیه شده از آن در درمان زخمهایی که به کندی درمان می شوند کاربرد دارد. این گیاه به دلیل داشتن ترکیباتی مانند پلی ساکاریدهای مشتق از کافئیک اسید^۱ و آلکلامیدها^۲، باعث تحریک تولیدسایتوکاین های IL-6 و IL-8 در عفونت لیشمانیا دونووانی می شود (۷۱، ۷۲، ۷۳).

Spooler و همکاران در سال ۲۰۰۷، اثر چند گیاه دارویی از جمله سرخارگل را روی چند گروه خوک آلوده به عفونت های کرمی *Trichuris suis*، *Ascaris suum* و *Oesophagostomum dentatum* مورد بررسی قرار دادند. چند گروه از خوک ها به طور تجربی با سه انگل فوق آلوده شدند. یک گروه از این خوک ها همراه با رژیم غذایی معمول هرروزه،

¹ Caffeic acid derivatives polysaccharides

² Alkylamides

مخلوطی از این گیاهان دارویی را به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. شمارش کرمهای روده خوک ها پس از ذبح آنها نشان داد در گروهی از خوک ها که همراه رژیم غذایی روزانه به میزان ۵٪ از گیاهان دارویی استفاده می کردند ، از عفونت متوسط با کرم های حلقوی جلوگیری شد (آلودگی با ۲۰۰ تخم انگل آلودگی متوسط در نظر گرفته شد)، اما گیاهان مذکور در دوز ۳٪ تاثیری در از بین بردن عفونت های مذکور نداشتند (۷۴).

کارایی سینامالدئید و عصاره سرخارگل بر ضد *Eimeria acervulina* در جوجه ها توسط Orengo و همکاران در سال ۲۰۱۲ بررسی شد. ۱۵۰mg/kg سینامالدئید، ۱۵۰ mg/kg عصاره سرخارگل و ۱۰۰۰mg/kg مخلوط عصاره سرخارگل و سینامالدئید به جوجه های ۱-۳۵ روزه خورانده شد. در این بررسی، کاهش معنی دار آسیب های دئودنال ناشی از عفونت های انگلی، فقط در جوجه های درمان شده با سینامالدئید دیده شد و در بقیه گروهها، کاهش معنی داری در این آسیب ها مشاهده نشد (۷۵).

در سال ۲۰۰۷ توسط Soudi و همکاران اثر عصاره اتانولی ریشه گیاه سرخارگل روی لیشمانیا در محیط کشت بررسی شد. در بین غلظت های مختلف مورد آزمایش (۰/۵، ۲/۵، ۵۰ و ۱۲۵) غلظتهای بیشتر (۱۲۵ و ۵۰ mg/ml) طی ۴۸ ساعت، ۱۰۰٪ پروماستیگوتها را از بین بردند. نتایج این بررسی مشخص کرد که عصاره اتانولی ریشه گیاه سرخارگل باعث ممانعت از رشد پروماستیگوتها می شود (۷۶).

در مطالعه ای دیگر که در قالب یک پایان نامه دانشجویی انجام شد، خواص آنتی اکسیدان و ضد میکروبی عصاره سرخارگل در غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵٪ بر علیه باکتری های

باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلی، انتروباکتریاسیه و استافیلوکوکوس اورئوس در خمیر شیرینی کلمپه مورد بررسی قرار گرفت. عصاره سرخارگل در تمام غلظتها اثر آنتی اکسیدانی از خود نشان داد. در نمونه های دارای ۰/۲۵٪ عصاره سرخارگل، تفاوت خاصی از نظر میزان باکتری نسبت به نمونه کنترل مشاهده نشد. در غلظت ۰/۵٪ تعداد میکروب ها پایین تر از کنترل بود و در غلظت ۰/۷۵٪ هیچ باکتری، کپک و مخمری مشاهده نشد که نشان می دهد این عصاره می تواند به عنوان ترکیب آنتی اکسیدان و ضد میکروبی عمل کند (۷۷).

Benson و همکاران در سال ۲۰۱۰ عصاره سرخارگل را روی سلول های دندریتیک موش بررسی کردند. سلول های دندریتیک منشا گرفته از مغز استخوان موش همراه با عصاره ریشه سرخارگل در غلظتهای ۵۰-۱۵۰ $\mu\text{g/ml}$ و عصاره برگ آن در غلظتهای ۵۰-۱۵۰ $\mu\text{g/ml}$ برای ۴۸ ساعت کشت داده شد. اندازه گیری مولکولهای CD11c، MHC II، CD86 و CD54 با روش فلوسایتومتری نشان داد عصاره ریشه سرخارگل در تمام غلظتها می تواند مارکرهای فوق را افزایش دهند و مشابه LPS عمل کند. عصاره برگ سرخارگل، CD11c را افزایش و CD86، MHC II و CD54 را کاهش داد و از بلوغ سلول های دندریتیک جلوگیری کرد. در این مطالعه ریشه گیاهان که غنی از پلی ساکارید بود، ترشح IL-6 و TNF- α را افزایش داد در حالی که عصاره برگ سرخارگل اثری روی ترشح سایتوکاین ها نداشت. نتایج این بررسی نشان داد که سرخارگل می تواند یک گیاه محرک و سیستم ایمنی باشد و اثر ضد التهاب وابسته به دوز داشته باشد و سبب تقویت قدرت فاگوسیتوزی در سیستم ایمنی ذاتی گردد (۸۵).

Wang و همکاران در کشور تایوان، اثر تحریک کننده عصاره الکلی و آبی ریشه، ساقه، برگ، گل و تمام گیاه را به طور جداگانه روی سلول های دندریتیک بررسی نمودند. از عصاره های مذکور،

غلظتهای $1 \mu\text{g/ml}$ ، 10 ، 100 و 500 تهیه و به مدت 24 ساعت با سلول های مورد مطالعه کشت دادند. بعد از این مدت بیان مارکرهای $CD14$ ، $CD32$ و $HLA-DR$ روی سلول های گروههای مختلف بررسی شد. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که عصاره گل و ریشه گیاه میزان $CD83$ را در سلول های دندریتیک به طور معنی داری افزایش می دهد و عصاره برگ و ساقه باعث کاهش معنی داری در بیان این مارکر می شود. عصاره ریشه، بیان ژن های $CCL2$ ، $CCL3$ و $MHCI$ را نیز افزایش داد که احتمالاً به دلیل ترکیبات ریشه گیاه است. غلظتهای 10 ، 100 ، $500 \mu\text{g/ml}$ عصاره تمام بخش های گیاه از جمله ساقه، برگ و عصاره ریشه و همین طور غلظت 100 و $500 \mu\text{g/ml}$ عصاره گل باعث افزایش $HLA-DR$ شد. در پایان مشخص شد که عصاره گیاه سرخارگل توانایی القای تمایز و بیان ژنهای مرتبط با این سلول ها را دارد (۸۶).

Burger و همکاران، تحقیقی روی تاثیر عصاره تازه تهیه شده و عصاره خشک شده سرخارگل در غلظتهای $10 \mu\text{g/ml}$ - 0.12 بر ماکروفاژ ها انجام دادند و نتایج را با گروه کنترل مواجه شده و مواجه نشده با اندوتوکسین مقایسه کردند. سلول های ماکروفاژ با غلظتهای مختلف ذکر شده کشت داده شدند. پس از 24 ساعت، میزان سایتوکاین های $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ ، $IL-10$ و $IL-1$ تولید شده از ماکروفاژها در سوپرناتانت با روش الایزا بررسی گردید. عصاره له شده سرخارگل باعث افزایش تولید سایتوکاین ها در ماکروفاژ نسبت به ماکروفاژهای مواجه نشده با عصاره شد و غلظت کمتر ($0.12 \mu\text{g/ml}$)، سایتوکاین بیشتری تولید کرد و با افزایش دوز عصاره، تولید این سایتوکاین ها کاهش یافت. این نتایج نشان داد که عصاره خالص نشده سرخارگل دارای اثر محرک بر پاسخ ایمنی است (۸۷).

فصل سوم

اهداف و فرضیات

هدف اصلی طرح

تعیین اثر پروتواسکولیسیدال چند گیاه دارویی بر پروتواسکولکس های کیست هیداتیک و تعیین خواص ایمنومدولاتوری گیاهان موثر بر پروتواسکولکس ها بر روی سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای.

اهداف فرعی

تعیین اثر پروتواسکولیسیدال رقت های مختلف اسانس اکالیپتوس روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک در مدت زمانهای مواجهه متفاوت.

تعیین اثر پروتواسکولیسیدال رقت های مختلف عصاره سرخارگل روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک در مدت زمانهای مواجهه متفاوت.

تعیین اثر پروتواسکولیسیدال رقت های مختلف اسانس بومادران روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک در مدت زمانهای مواجهه متفاوت.

تعیین اثر پروتواسکولیسیدال رقت های مختلف اسانس رازیانه روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک در مدت زمانهای مواجهه متفاوت.

تعیین اثر پروتواسکولیسیدال رقت های مختلف عصاره افسنطین روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک در مدت زمانهای مواجهه متفاوت.

تعیین اثر پروتواسکولیسیدال رقت های مختلف عصاره برگ گردو روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک در مدت زمانهای مواجهه متفاوت.

تعیین اثر پروتواسکولیسیدال رقت های مختلف عصاره آزاددرخت روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک در مدت زمانهای مواجهه متفاوت.

تعیین اثر اسانس یا عصاره گیاهان دارویی موثر بر پروتواسکولکس ها بر روی مارکر بلوغ CD86 سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای.

تعیین اثر اسانس یا عصاره گیاهان دارویی موثر بر پروتواسکولکس ها بر روی مارکر بلوغ MHCII سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای.

تعیین اثر اسانس یا عصاره گیاهان دارویی موثر بر پروتواسکولکس ها بر روی مارکر بلوغ CD40 سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای.

اهداف کاربردی

شناسایی داروهای گیاهی پروتواسکولیسیدال با غلظت های مشخص و با مدت زمانهای مواجهه معین جهت استفاده در اعمال جراحی کیست هیداتیک، همچنین شناسایی داروهای گیاهی پروتواسکولیسیدال با اثرات تقویت کننده سیستم ایمنی.

فرضیه ها

اسانس اکالیپتوس بر روی پروتواسکولکس ها موثر می باشد.

عصاره سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها موثر می باشد.

اسانس بومادران بر روی پروتواسکولکس ها موثر می باشد.

اسانس رازیانه بر روی پروتواسکولکس ها موثر می باشد.

عصاره افسنطین بر روی پروتواسکولکس ها موثر می باشد.

عصاره برگ گردو بر روی پروتواسکولکس ها موثر می باشد.

عصاره آزاد درخت بر روی پروتواسکولکس ها موثر می باشد.

اسانس یا عصاره گیاهان دارویی موثر بر پروتواسکولکس ها بر روی مارکر بلوغ CD86 سلول های

عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای موثر می باشد.

اسانس یا عصاره گیاهان دارویی موثر بر پروتواسکولکس ها بر روی مارکر بلوغ MHCII سلول

های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای موثر می باشد .

اسانس یا عصاره گیاهان دارویی موثر بر پروتواسکولکس ها بر روی مارکر بلوغ CD40 سلول های

عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای موثر می باشد .

نوع مطالعه

پایه (تجربی)

جدول شماره ۱: جدول متغیرها

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه ای		
ویابیلیتی کیستهای هیداتیک		×	×				درصد زنده ماندن پروتواسکولکسها در لوله های حاوی نمونه های مورد آزمایش	رنگ پذیری یا عدم رنگ پذیری با انوزین %۰/۱
اثر اسانس یا عصاره گیاهان دارویی	×				×		اثر گذاری اسانس یا عصاره گیاهان روی پروتواسکولکس ها	دارد/ندارد
سایتوکاین		×	×				مقدار تولید سایتوکاین در مایع رویی کشت سلولی	پیکوگرم بر میلی لیتر
مارکهای بلوغ سلولی		×	×				مقداریان پروتئینهای بلوغ در سطح سلول با روش فلو سائتومتری	درصد

فصل چهارم

مواد و روش ها

بررسی اثر عصاره و اسانس گیاهان دارویی بر روی پروتواسکولکس ها

وسایل مورد نیاز:

لوله فالکن ۱۵ میلی لیتری (Nunc, Denmark)

سرنگ ۵، ۱۰ و ۲۰ سی سی (سوپا ایران)

ظروف شیشه ای

انکوباتور ۳۷ درجه (Laboven)

اتوکلاو (Reyhan teb)

سانتریفوژ (Clements 2000)

هود آزمایشگاهی (Faryad Tehran)

میکروسکوپ معمولی (Zeiss-Germany)

ترازوی دیجیتال (Bosch)

سمپلر متغیر ۱۰۰۰-۱ لاند (Eppendorf)

حلال DMSO

اثوزین ۱/۰٪

سرم فزیولوژی استریل

PH متر (Meterohm-Switzerland)

روش کار

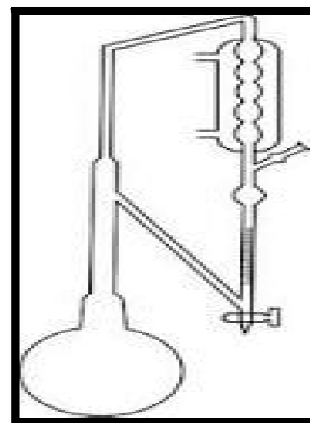
جمع آوری کیست های هیداتید و پروتواسکولکسها

کبد حاوی کیست های هیداتید از کشتارگاه قزوین تهیه، به بخش انگل شناسی منتقل و با رعایت شرایط استریل محتویات کیست ها آسپیره و در لوله های استریل به صورت مجزا ریخته شد. کیستهای کلسیفیه و چرکی شده از مطالعه خارج شدند. پس از ضدعفونی سطح کیست ها با بتادین، محتویات کیست ها توسط سرنگ های ۵ و ۱۰ میلی لیتری تخلیه و داخل لوله های آزمایش استریل ریخته شد. کیست ها به کمک میکروسکوپ نوری از نظر باروری مورد بررسی قرار گرفتند. در صورت باروری کیست ها، *viability* (زنده بودن) پروتواسکولکس ها توسط رنگ آمیزی با اثوزین ۱/۰٪ از روی حرکت سلول های شعله شمعی مورد ارزیابی قرار گرفت. کیست هایی که *viability* آنها بیش از ۹۰٪ بود جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند (۷۶، ۸۸).

جمع آوری، شناسایی و تهیه اسانس گیاهان دارویی

گیاهان مختلف توسط متخصص گیاه شناسی از مزرعه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج شناسایی و جمع آوری شدند. یک نمونه از گیاهان، در پژوهشکده ثبت و نگهداری و بقیه در سایه خشک شد. به منظور استخراج بهتر اسانس، نمونه های خشک شده از گیاهان شامل برگ ها، ساقه ها و سرشاخه ها به وسیله دستگاه آسیاب خرد گردید. برای جلوگیری از هدر رفتن اسانس ها، بعد از خرد شدن، گیاه بلافاصله به دستگاه اسانس گیری منتقل گردید. اسانس گیری به روش تقطیر با آب جوش و توسط دستگاه اسانس گیری کلونجر (Clevenger) که توسط شیشه گری ساخته می شود انجام گردید. طبق این روش پودر قسمت های هوایی گیاه در بالن ریخته شده و به آن آب مقطر اضافه شد و سپس به دستگاه کلونجر متصل گردید. برای تکمیل شدن عمل اسانس گیری تا زمان ثابت ماندن مقدار اسانس، عمل اسانس گیری ادامه یافته (۴ساعت) و پس از خاتمه کار و سرد شدن دستگاه، اسانس استخراج شده به کمک حلال پنتان جداسازی و پس از تبخیر کامل حلال، جهت محاسبه حجم آن، به مزور کوچک منتقل شده و تا زمان آنالیز و بررسی میکروبی دور از نور در یخچال نگهداری گردید. بطور خلاصه برای تهیه عصاره گیاهان، پس از خشک کردن و آسیاب کردن آنها (مقدار نیم کیلوگرم) ابتدا توسط اتانول و به وسیله دستگاه پرکولاتور عصاره گیری می شوند. این عمل سه بار تکرار و سپس عصاره های حاصل بوسیله دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ

می شوند. میزان عصاره خشک شده محاسبه و در ظروف پلیت دردار، داخل یخچال تا هنگام آزمایش نگهداری می شوند (۸۹).

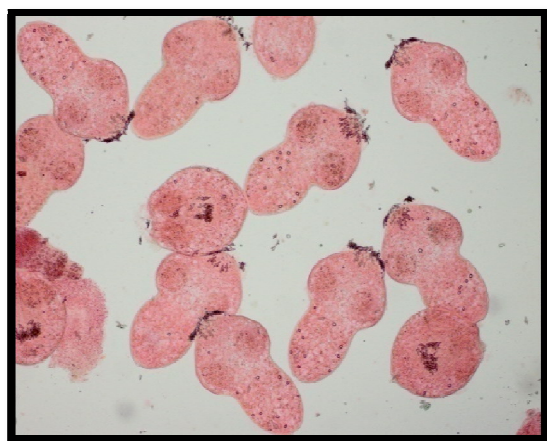


نمونه ای از دستگاه کلونجر که به فرم فارماکوپه معروف است

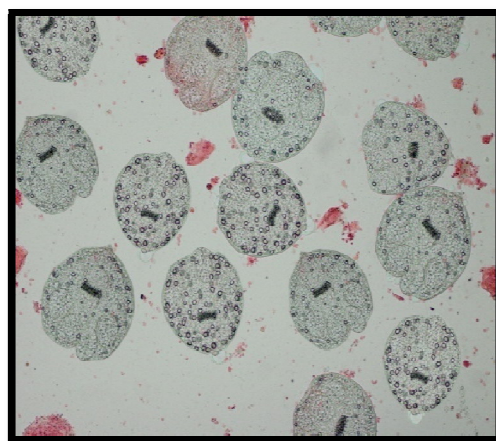
بررسی اثر پروتواسکولکسیدال اسانس یا عصاره گیاهان

در این مطالعه ۶ غلظت از اسانس یا عصاره اتانولی هر گیاه مورد آزمایش (غلظتهای ۳، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰) در مدت زمانهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه با پروتواسکولکس های جمع آوری شده مجاور گشتند. برای تهیه غلظتهای مذکور از نرمال سالین و جهت سهولت حل شدن این اسانس یا عصاره ها در نرمال سالین به آنها حدود ۰/۳ میلی لیتر DMSO اضافه و لوله ها با مگنت به هم زده شدند. در هر لوله آزمایش ۲/۵ میلی لیتر از محلول اسانس یا عصاره با غلظت مورد نظر ریخته شده و روی آن ۱۰۰ میکرولیتر از مایع حاوی ۷۰۰-۱۰۰۰ پروتواسکولکس ریخته شد. محتویات این لوله ها برای مدت زمانهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷° سانتی گراد قرار گرفت. پس از طی این مدت زمانها، قسمت رویی مایع توسط پی پت پاستور حذف گردید. در ادامه رسوب باقی مانده که شامل پروتواسکولکس ها بود با

اثوزین ۰/۱٪ مخلوط شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه از زمان انکوباسیون، قسمت رویی حذف گردید و از رسوب باقی مانده گسترش تهیه شد و توسط میکروسکوپ نوری ویابیلیتی پروتواسکولکس ها بررسی شد. پروتواسکولکس های رنگ شده به منزله انگل های مرده و پروتواسکولکس های رنگ نشده انگل های زنده قلمداد گردیده و شمارش شدند و درصد پروتواسکولکسهای مرده مورد محاسبه قرار گرفت. همچنین برای اطمینان از صحت آزمایشات از گروه کنترل (سرم فیزیولوژی به جای اسانس یا عصاره گیاه) استفاده شد. همچنین این آزمایش ۳ بار به طور مستقل تکرار گردید (۲۱، ۳۴، ۹۰، ۹۱).



تصویر شماره (۶): پروتواسکولکسهای مرده پس از مواجهه با عصاره یا اسانس گیاهان دارویی



تصویر شماره (۵): پروتواسکولکسهای زنده پیش از مواجهه با عصاره یا اسانس گیاهان دارویی

جداسازی، تخلیص و کشت سلولی سلول های دندریتیک (DCs) با روش

بید مغناطیسی یا Magnetic Cell Sorting(MACS)

مواد و روش ها

تخلیص سلول دندریتیک $CD11c^+$ DCs از طحال موش

جهت جداسازی سلول مورد نظر، نیاز به هضم بافت طحال و تهیه سوسپانسیون تک سلولی از

طحال موش می باشد.

مواد و وسایل لازم:

- موش BALB/C حدود ۶ تا ۸ هفته ای (انستیتو پاستور تهران و موسسه رازی)

- ست جراحی استریل شامل پنس و قیچی و ...

- صفحه جراحی

- لوله های فالکن ۱۵ ml و ۵۰ (Nunc,Denmark)

- پتری دیش ۶۰ mm (Nunc,Denmark)

- توری سیمی ۱۵۰ μm (mesh)

- پلیت شیشه ای ۶۰ mm (Nunc,Denmark)

- سرنگ ۲ ml (سوپا ایران)

- بافر هضم کننده

- پی پت پاستور پنبه گذاری شده استریل

- سمپلر متغیر ۱۰۰۰-۱ لاند

- سر سمپلر

- سانتریفیوژ یخچال دار (Eppendorf AC, Germany)

- هود لامینار (Holten Thermo, USA)

- انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵٪ CO₂

- میکروسکوپ معمولی (Zeiss, Germany)

- میکروسکوپ معکوس (Nikon, JAPAN)

- نایکودنز (Axis-shield, NORWAY)

- پلیت پلاستیکی ۶۰mm (Nunc, Denmark)

- محیط کشت RPMI-1640 (Gibco, UK)

- FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, UK)

- بافر PBS

- EDTA (Merck, Germany)

– وسایل شمارش سلول (لام نئوبار و لامل)

– محلول هنکس Hanks (۲ ویال شیشه ای)

– محلول تریپان بلو

– پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه ای (۴ عدد)

– لوله آزمایش شیشه ای متوسط (۵۰ عدد)

تهیه بافر هضم کننده

مواد و وسایل لازم:

– استوک آنزیم کلاژناز D یک ویال (۵۰ میلی گرم پودر کلاژناز را در ۵ سی سی محلول

هنکس Hanks حل و سپس فیلتر نموده و به ویال های ۵۰۰ لاندا تقسیم و در فریزر ۲۰- درجه

سانتی گراد نگه داری نموده و موقع تزریق هر ویال را در ۴/۵ سی سی RPMI حل می نماییم).

– محیط کشت RPMI- 1640 حاوی ۲ درصد FCS

روش کار

برای تهیه ۱۰ ml بافر هضم کننده ۱ ml از استوک کلاژناز D با ۹ ml محیط کشت حاوی ۲٪ FCS

مخلوط گردید. تمام این مراحل روی یخ صورت گرفت. تا موقع مصرف، بافر هضم کننده باید

برروی یخ نگهداری شود.

جدا سازی سلولهای عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای از طحال موش

برای این عمل هر بار از چند سر موش BALB/c استفاده شد. موشها در ابتدا نخاعی شده و در الکل ۷۰ درجه قرار داده شدند. سپس روی تخت جراحی به سمت راست بدن خوابانده شده و توسط یک پنس و قیچی حدود ۵ سانتی متر از پوست پهلوی چپ آن را برداشته و بعد توسط پنس و قیچی دیگری پرده صفاق ناحیه، برش داده شده و کنار زده شد. طحال از ناحیه برش خورده خارج شد. موقع در آوردن طحال چربیهای اطراف آن به طور کامل جدا گردید و در پلیت ۶۰mm شیشه‌ای استریل حاوی PBS سرد قرار داده شد. پس از شستشوی سطحی طحال آن را به پلیت دیگر منتقل کرده و با استفاده از سرنگ، مقدار ۱ ml بافر هضم کننده از قسمت رأس آن تزریق شد. در حین تزریق بافر هضم کننده، نوک سر سوزن به قسمتهای عمقی طحال هدایت می‌شود سپس با استفاده از پی‌پت پاستور سوسپانسیون تک سلولی جدا شده و در یک لوله فالكون ۵۰ ml جمع آوری و بلافاصله روی آن EDTA ریخته تا به غلظت نهائی ۵ mM برسد و به یخچال ۴ درجه سانتی گراد منتقل شد. سپس بافت طحال توسط قیچی جراحی تیز به قطعات حدود ۱mm خرد شد و مقدار ۲ml بافر هضم کننده به آن اضافه گردید. قطعات طحالی چندین بار پی پتاژ شده و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵٪ CO₂ انکوبه شد. هر ۱۰ دقیقه یکبار پلیت تکان داده شد پس از گذشت ۴۵ دقیقه پلیت شیشه‌ای حاوی قطعات طحال از انکوباتور به زیر هود منتقل شده و سپس جهت غیر فعال سازی آنزیم، به پلیت EDTA اضافه شد تا به غلظت نهایی ۵ mM برسد. جهت جداسازی قسمتهای هضم نشده طحال، سوسپانسیون داخل پلیت از mesh عبور داده شد و باقیمانده بافتی آن روی mesh له شده و سپس mesh توسط محیط کشت شستشو داده شد.

سوسپانسیون سلولی بدست آمده دوبار با محیط PBS سرد حاوی ۵mM EDTA به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰ xg ودمای ۴ درجه شستشو داده شد و سپس توسط تریپان بلو شمارش و تعیین درصد حیات گردید.

تهیه محیط گرادیان ایزوتونیک نایکودنز

مواد و وسایل لازم:

پودر نایکودنز (Nycodenz ,Nycomed ,Oslo ,Norway)

کلرید سدیم (Merck, Germany)

کلرید پتاسیم (Merck, Germany)

EDTA Na₂Ca (Merck, Germany)

Tris-Hcl (Sigma, USA)

روش تهیه نایکودنز ۱۲ درصد:

ابتدا محلول ۵ میلی مولار از Tris-Hcl تهیه شد و PH آن به ۷/۵ رسانده شد سپس به آن Kcl و EDTA Na₂Ca اضافه گردید به طوریکه غلظت نهائی این دو ماده به ترتیب به ۳ میلی مولار و ۰/۳ میلی مولار رسید. در ۱۰۰ میلی لیتر از محلول فوق ۰/۷۵ گرم Nacl حل گردید (لازم به ذکر است که میتوان بجای Nacl از سوکروز استفاده کرد و ۷/۴۵ گرم سوکروز در محلول شماره ۱ حل نمود). به منظور تهیه محلول نایکودنز باغلظت ۱۲ درصد، ابتدا ۶ گرم پودر نایکودنز را در آب دیونیزه حل کرده و حجم نهائی به ۱۰ میلی لیتر رسید (محلول ۶۰ درصد نایکودنز). سپس ۹/۲

میلی لیتر آن با ۱۰/۸ میلی لیتر از محلول شماره ۱ مخلوط گردید و محلول ۲۷/۶ درصد نایکودنز حاصل گردید. در نهایت با مخلوط کردن ۱۷/۴ میلی لیتر از محلول ۲۷/۶ درصد با ۲۲/۶ میلی لیتر از محلول شماره ۲، ۴۰ میلی لیتر محلول ۱۲ درصد نایکودنز بدست آمد.

جداسازی سلول های کم چگال توسط نایکودنز

روش کار :

سوسپانسیون سلولی بدست آمده را پیپتاژ نموده تا کلامپ تشکیل نشود. سپس در حجم ۳ تا ۴ml محیط روی ۳ml محیط نایکودنز با دانسیته ۱۲ ریخته شده و مجموعه به مدت ۱۷ دقیقه در ۶۳۰×g در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، سلول های با دانسیته بالا که غالباً شامل گلبولهای قرمز و قسمت قابل توجهی گلبولهای سفید بودند در کف لوله فالكون رسوب کرده و سلول های کم چگال که شامل سلول های دندریتیک و مقداری لنفوسیت و منوسیت بودند در حد فاصل بین محیط کشت و محیط گرادیان قرار گرفتند. سلول های بین دو سطح توسط پیپت پاستور به آرامی برداشته و داخل یک لوله فالكون ۱۵ استریل ریخته شد. سلول های بدست آمده دو بار با محیط PBS به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰×g و دمای ۴درجه سانتی گراد شستشو داده شدند. این سلول ها توسط رنگ تریپان بلو رنگ آمیزی شده و تعداد و درصد حیات آنها بررسی شد.

جداسازی و تخلیص CD11c⁺ DCs با روش بید مغناطیسی (MACS)

به طور کلی سه جمعیت اصلی سلول دندریتیک وجود دارند که سلول دندریتیک لنفوئیدی یکی از آنهاست. این رده از سلول دندریتیک دارای مارکر CD8alpha⁺ می باشند که دو گروه دیگر فاقد

این مارکر هستند. به منظور تهیه سلول دندریتیک از طحال موش، کیت جداسازی سلول دندریتیک (CD11c⁺ DCs) از شرکت Miltenyi biotec کشور آلمان خریداری گردید.

Magnetic Cell Sorting (MACS) روشی است که سلولی خاص با کمک آنتی بادی منوکلونال اختصاصی، بید مغناطیسی و ستون، جداسازی می گردند. مزیت این روش در جدا نمودن سلول، دقت، حساسیت و درجه خلوص بالا است. برای جداسازی و تخلیص این رده سلولی، بعد از کشتن موش، طحال را جدا کرده و با کمک روشهای مکانیکی و آنزیمی با آنزیم کلاژناز دی^۱، هضم بافت طحال و آزادسازی سلول ها انجام می شود. در مرحله بعد برای دستیابی به سلول های دندریتیک از نایکودنز^۲، جهت جداسازی و تهیه سلول های تک هسته ای با گرادیان کم استفاده می شود. سپس طبق دستور کیت، جداسازی سلول با کمک آنتی بادهای منوکلونال اختصاصی، ستون MS و MACS Separator مناسب، تخلیص سلولی انجام می شود. به طور خلاصه با روش انتخاب مثبت (Positive selection)، سلول های دندریتیک با مارکر CD11c با کمک آنتی بادی منوکلونال اختصاصی متصل به بید مغناطیسی ضد شاخص سلول های CD11c و بافر شستشو اختصاصی در شرایط محیط مغناطیسی در ستون باقی مانده و دیگر سلول ها از سوسپانسیون سلولی حذف می گردند. در مرحله بعد ستون که حاوی سلول های دندریتیک از شرایط مغناطیسی خارج می گردد و با بافر سلول ها از ستون جدا می شوند. نتیجه حاصل تخلیص سلول های دندریتیک با مارکر CD11c⁺ می باشد که با رنگ آمیزی توسط آنتی بادی اختصاصی با فلوسیتومتری تایید می شوند.

¹ Collagenase D

² Nycodenz

ارزیابی بلوغ DCs $CD11c^+$ با روش فلوسیتومتری

بعد از جدا سازی و تخلیص، سلول های دندریتیک با مارکر $CD11c^+$ مورد فلوسیتومتری قرار گرفتند. برای بررسی بلوغ سلولی، گروه های مختلف بعد از کشت با عصاره یا اسانس گیاهان در محیط کشت سلولی همراه با 10% FCS به مدت 48 ساعت، سلول ها با PBS شستشو شده و سپس با آنتی بادیهای منوکلونال فلورسنته و ایزوتیپ کنترل مربوطه برای بررسی بلوغ این سلول ها جهت مارکرها $CD86$ ، $CD11c$ ، $MHCII$ و $CD40$ ، فلوسیتومتری شدند.

آنتی بادی های استفاده شده جهت انجام فلوسیتومتری به شرح زیر می باشند:

فلوسایتومتری

مواد و وسایل مورد نیاز:

- آنتی بادی منوکلونال کانژوگه علیه شاخصهای سطحی سلول های دندریتیک
- آنتی بادی ایزوتیپ کنترلهای مربوطه
- سانتریفیوژ یخچالدار (Eppendorf AC ,Germany)
- پارافرم آلدئید ۱٪ (Merck ,Germany)
- لوله های مخصوص فلوسایتومتری (BD)
- دستگاه فلوسایتومتری (BD)
- نرم افزار تجزیه و تحلیل داده های فلوسایتومتری (BD)
- بافر فلوسایتومتری

روش کار:

رنگ آمیزی سلول ها مستقیم و به صورت تک رنگی و دو رنگی انجام گرفت:

- از سلول های دندریتیک بدست آمده در هر یک از مراحل قبلی، سوسپانسیون سلولی حاوی

$10^4 \times 5$ سلول به ازاء هر میلی لیتر تهیه گردید.

- سوسپانسیون سلولی در حجم مساوی در لوله های مورد نیاز تقسیم گردید (100 میکرو لیتر) و به

هر لوله به جز لوله کنترل، 0.5 میکرو گرم از آنتی بادی مورد نظر اضافه و به مدت 30 دقیقه بر روی

یخ انکوبه شد .

- به لوله کنترل 0.5 میکرو گرم ایزوتایپ کنترل کانژوگه با PE و یا FITC اضافه و همزمان با سایر

لوله ها بمدت 30 دقیقه روی یخ انکوبه گردید.

- دو بار نمونه ها با بافر فلوئوسیتومتری به مدت 5 دقیقه در دور $400g$ و دمای $4^\circ C$ شسته شدند.

- نمونه ها با پارا فرم آلدئید 1% فیکس شدند.

نتایج توسط دستگاه فلوئوسایتومتری BD خوانده شد و توسط نرم افزار BD آنالیز گردید.

جدول شماره ۲: جدول لیست آنتی بادیهای منوکلونال جهت فلوسیتومتری

No	Antibody (Ab)	Conjugate	Company	Country	clone	Isotype
1	Rat Anti Mouse CD40	FITC	BD	USA	3/23	Rat IgG2 α
2	Hamster Anti Mouse CD11c	PE	BD	USA	HL3	Hamster IgG1
3	Anti mouse CD86	FITC	BD	USA	GL1	IgG2 α
4	Isotype Control Hamster IgG1	PE	BD	USA	R35- 95	Hamster IgG1
5	Isotype Control Rat IgG2 α	FITC	BD	USA	G235- 2356	Rat IgG2 α

فصل پنجم

یافته ها

در این مطالعه اثرات اسانس و عصاره اتانولی ۷ گیاه آزاد درخت، گردو، افسنتين، رازیانه، بومادران، اکالپتوس و سرخارگل در شرایط آزمایشگاهی و در دمای ۳۷° سانتی گراد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک در غلظتهای ۳، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ و در مدت زمانهای مواجهه ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه مورد آزمایش قرار گرفت و آزمایش ها ۳ بار تکرار شد. میانگین اثر پروتواسکولیسیدال هر کدام از گیاهان مذکور در غلظتها و مدت زمان های مختلف در جداول شماره ۳ تا ۹ خلاصه شده است.

عصاره آزاد درخت در تمام غلظتهای مورد استفاده و مدت زمانهای مواجهه بر روی پروتواسکولکس ها اثر چشمگیری نداشت (جدول شماره ۳). عصاره برگ گردو نیز در غلظتهای مورد استفاده و مدت زمانهای مواجهه اثر چندانی بر روی پروتواسکولکس ها نداشت. در غلظت ۱۰۰ mg/ml پس از ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه مواجهه به ترتیب ۹۰/۵۲، ۹۳/۳۰، ۹۹/۵۱ و ۱۰۰٪ پروتواسکولکسها را از بین برد (جدول شماره ۴). عصاره افسنتين در همه غلظتها و مدت زمانهای مواجهه به جز ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ تاثیر چندانی بر روی پروتواسکولکس ها نداشت. در غلظت ۵۰ mg/ml در دقایق ۵۰ و ۶۰ مواجهه به ترتیب باعث کشته شدن ۴۸/۵۱ و ۵۲/۵۳ درصد از پروتواسکولکس ها شد. در غلظت ۱۰۰ mg/ml از دقایق ۱۰ تا ۶۰ مواجهه، باعث مرگ ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها شد. (جدول شماره ۵). اسانس رازیانه در غلظتهای ۳ mg/ml و ۵ اثر قابل توجهی بر روی پروتواسکولکس ها

نداشت. ولی در غلظت 10 mg/ml پس از ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه مواجهه به ترتیب ۴۶/۲۵، ۵۶/۰۴، ۶۵/۹۳ درصد و با غلظت 25 mg/ml بعد از ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب ۹۸/۲۳، ۹۹/۶۴، ۹۹/۷۱، ۹۹/۷۸، ۹۹/۸۳ و ۹۹/۹۱٪ از پروتواسکولکس ها را از بین برد. در غلظتهای 50 mg/ml و ۱۰۰ اثر گیاه مذکور ۱۰۰٪ بود. (جدول شماره ۶). اسانس گیاه بومادران در غلظت 3 mg/ml از ۳۰ تا ۶۰ دقیقه به ترتیب روی ۶۹/۹۴، ۷۱/۹۱، ۷۲/۰۵ و ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس ها و در غلظت 5 mg/ml در ۲۰ و ۳۰ به ترتیب روی ۵۳/۲۹، ۷۲/۵۵ و از ۴۰ تا ۶۰ روی ۱۰۰ درصد پروتواسکولکسها و در غلظت 10 mg/ml در ۱۰، ۲۰ و ۳۰ به ترتیب روی ۶۸/۶۲، ۸۸/۴۲، ۹۶/۲۱ درصد و از ۴۰ تا ۶۰ روی ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس ها تاثیر داشت. در غلظتهای 25 mg/ml ، ۵۰ و ۱۰۰ در تمام مدت زمانهای مواجهه اثرکشدگی بر روی پروتواسکولکس ها ۱۰۰٪ بود. (جدول شماره ۷). اثر اسانس اکالیپتوس بر روی پروتواسکولکس ها در غلظت 3 mg/ml و ۵ در تمام مدت زمانهای مواجهه به جز ۶۰ دقیقه مواجهه و غلظت 5 mg/ml غیر قابل ملاحظه بود. در غلظت و مدت زمان مواجهه مذکور این اثر ۵۳/۳۳٪ بود. غلظت های 10 mg/ml ، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ در تمام مدت زمانهای مواجهه، باعث از بین رفتن ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها شدند. (جدول شماره ۸). عصاره گیاه سرخارگل در غلظت 3 mg/ml در تمام مدت زمانهای مواجهه اثر پروتواسکولیسیدال قابل ملاحظه ای نداشت اما در غلظت 5 mg/ml در زمانهای مواجهه ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه، به ترتیب روی ۶۹/۰۵، ۷۵/۸۸، ۸۵/۶۷ درصد و در مدت زمانهای مواجهه ۴۰ تا ۶۰ دقیقه روی ۱۰۰٪ پروتواسکولکسها اثر کشندگی داشت (جدول شماره ۹) (تصاویر شماره ۵ و ۶).

با استفاده از تست Tukey اثر مقایسه ای هر کدام از غلظت‌های ۳، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ در مدت زمانهای مواجهه ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه مورد مقایسه قرار گرفت و همانطور که جداول نشان می دهند هر کدام از غلظتها وقتی در مدت زمانهای مختلف با پروتواسکولکسها مواجه می شدند، نتایج اثر آنها در بعضی از زمانها معنی دار نبوده و در بعضی از زمانها معنی دار بود. چنانچه در جداول مذکور مشاهده می شود در اثر تاثیر غلظتهای مختلف اسانس و عصاره های گیاهان بر روی پروتواسکولکسها در مدت زمانهای فوق ۱ تا ۴ گروه همگنی مشاهده شدند که این گروهها ارتباطشان با یکدیگر معنی دار نبود ولی در ارتباط با گروههای دیگر ارتباطشان معنی دار بود (جداول شماره ۱۰-۳۸).

جدول شماره ۳: اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف عصاره گیاه آزاد درخت در مدت زمانهای مختلف مواجهه

میانگین مرگ و میر پروتواسکولکس ها پس از مدت زمان های مواجهه (درصد)							
غلظت (mg/ml)	آزمایشات	10 (min)	20 (min)	30 (min)	40 (min)	50 (min)	60 (min)
3	1	2.76(21/762)	3.47(33/951)	3.91(28/716)	4.07(30/738)	4.26(36/846)	5.56(45/810)
	2	2.48(24/966)	2.96(22/742)	3.70(28/756)	4.37(40/916)	3.41(24/704)	4.85(32/660)
	3	2.17(16/736)	2.51(24/956)	3.35(24/716)	4.24(30/708)	4.35(42/966)	3.70(24/648)
	total	2.48(61/2464)	2.98(79/2649)	3.66(80/2188)	4.23(100/2362)	4.05(102/2516)	4.77(101/2118)
5	1	3.49(27/774)	4.08(39/957)	4.40(40/910)	4.51(36/798)	6.02(50/830)	7.79(72/924)
	2	3.60(24/666)	3.789(32/846)	4.17(36/864)	4.88(38/778)	5.96(51/855)	6.67(54/810)
	3	3.04(30/986)	3.58(28/782)	4.04(34/842)	4.36(36/826)	4.64(32/690)	5.93(46/776)
	total	3.34(81/2426)	3.83(99/2585)	4.21(110/2616)	4.58(110/2402)	5.60(133/2375)	6.85(172/2510)
10	1	3.62(30/828)	4.14(28/676)	5.00(48/960)	5.09(34/668)	6.78(56/826)	8.24(70/850)
	2	3.79(38/1002)	4.21(34/808)	4.82(45/933)	5.90(54/916)	6.86(48/700)	4.81(40/832)
	3	2.93(30/1024)	4.05(39/963)	4.67(45/963)	5.35(40/748)	6.62(54/816)	9.24(78/844)
	total	3.43(98/2854)	4.05(39/963)	4.83(138/2856)	5.49(128/2332)	6.75(158/2342)	7.44(188/2526)
25	1	4.04(36/891)	4.37(34/778)	5.40(42/778)	5.64(44/780)	7.69(60/780)	8.57(72/840)
	2	4.26(40/940)	4.43(32/722)	4.79(42/876)	5.95(40/672)	8.52(78/915)	10.19(96/942)
	3	3.95(38/962)	4.35(28/644)	4.77(42/880)	3.99(36/903)	10.33(76/736)	9.78(88/900)
	total	4.08(114/2793)	4.38(94/2144)	4.97(126/2534)	5.10(120/2355)	8.80(214/2431)	9.55(256/2682)
50	1	5.06(48/948)	5.21(38/730)	6.23(50/802)	6.25(60/960)	9.33(84/900)	12.29(88/716)
	2	5.20(44/846)	6.82(52/762)	5.81(48/826)	6.32(48/760)	10.07(84/834)	13.76(126/916)
	3	4.90(40/816)	4.99(34/682)	5.41(44/814)	6.15(44/716)	9.23(72/780)	13.79(118/856)
	total	5.06(132/2610)	5.70(124/2174)	5.81(142/2442)	6.24(152/2436)	9.55(240/2514)	13.34(332/2488)
100	1	8.26(63/763)	14.89(109/732)	22.15(194/876)	24.33(219/900)	29.52(258/874)	30.69(248/808)
	2	8.24(72/874)	15.78(136/862)	17.85(136/762)	19.58(195/996)	32.69(303/927)	23.18(204/880)
	3	8.00(72/900)	13.78(124/900)	15.29(122/798)	19.39(140/722)	27.00(182/674)	33.18(286/862)
	total	8.16(207/2537)	14.80(369/2494)	18.56(452/2436)	21.16(554/2618)	30.02(743/2475)	28.94(738/2550)
control	1	1.60(12/752)	2.51(18/716)	2.71(22/812)	2.80(22/786)	4.44(40/900)	3.51(32/912)
	2	1.40(10/712)	1.92(18/939)	3.29(26/790)	3.45(24/696)	3.81(32/840)	4.51(42/932)
	3	1.36(10/738)	1.82(14/770)	3.10(28/902)	3.14(22/700)	3.73(32/858)	4.12(34/826)
	total	1.45(32/2202)	2.06(50/2425)	3.03(76/2504)	3.12(68/2182)	4.00(104/2598)	4.04(108/2670)

جدول شماره ۴ : اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف عصاره برگ گردو در مدت زمانهای مختلف مواجهه

میانگین مرگ و میر پروتواسکولکس ها پس از مدت زمان های مواجهه (درصد)							
غلظت (mg/ml)	آزمایشات	10 (min)	20 (min)	30 (min)	40 (min)	50 (min)	60 (min)
3	1	5.36(48/896)	5.50(48/873)	7.06(54/765)	12.97(120/925)	13.27(130/980)	15.82(125/790)
	2	4.74(36/760)	5.57(38/682)	7.02(50/712)	12.89(108/838)	12.93(106/820)	16.83(106/630)
	3	4.20(40/952)	5.54(54/975)	6.84(63/921)	12.25(100/816)	12.47(90/722)	16.57(112/676)
	total	4.75(124/2608)	5.53(140/2530)	6.96(167/2398)	12.72(328/2579)	12.93(326/2522)	16.36(343/2096)
5	1	5.47(45/822)	6.43(54/840)	7.14(60/840)	14.29(125/875)	14.81(140/945)	16.67(135/810)
	2	6.23(44/706)	6.90(52/754)	7.87(64/814)	14.10(132/936)	15.94(146/916)	19.88(192/966)
	3	5.26(40/760)	6.89(54/784)	7.75(64/826)	13.90(114/820)	13.95(108/774)	19.14(134/700)
	total	5.64(129/2288)	6.73(160/2378)	7.58(188/2480)	14.10(371/2631)	14.95(394/2635)	18.62(461/2476)
10	1	9.03(81/897)	9.05(76/840)	9.80(80/816)	15.04(102/678)	18.46(180/975)	18.85(147/780)
	2	9.76(74/758)	9.51(74/778)	9.69(68/702)	13.46(116/862)	17.16(145/845)	20.76(142/684)
	3	10.02(88/878)	9.11(84/922)	9.91(64/646)	13.05(106/812)	17.14(162/945)	20(158/790)
	total	9.59(243/2533)	9.21(234/2540)	9.80(212/2164)	13.78(324/2352)	17.61(487/2765)	19.83(447/2254)
25	1	10.11(90/890)	17.86(150/840)	13.68(135/987)	13.71(135/985)	21.94(204/930)	22.70(210/925)
	2	11.94(86/720)	18.84(156/828)	13.48(100/742)	14.61(104/712)	22.60(188/832)	21.41(206/962)
	3	12.89(100/776)	17.40(134/770)	14.89(112/752)	15.99(134/838)	21.41(206/962)	21.87(164/750)
	total	11.57(276/2386)	18.05(440/2438)	13.99(347/2481)	14.71(373/2535)	21.95(598/2724)	21.99(580/2637)
50	1	12.54(123/981)	13.94(105/735)	14.29(120/840)	24.32(225/925)	25(215/860)	25.13(235/935)
	2	12.27(118/962)	15.28(114/746)	15.60(136/872)	24.03(236/982)	22.67(204/900)	26.84(182/678)
	3	12.53(106/846)	13.96(122/874)	16.45(154/936)	23.02(198/860)	22.69(152/670)	27.49(204/742)
	total	12.44(347/2789)	14.37(341/2373)	15.48(410/2648)	23.82(659/2767)	23.50(571/2430)	26.37(621/2355)
100	1	27.78(200/720)	27.88(232/832)	97.84(904/924)	90.77(708/780)	100(840/840)	100(756/756)
	2	23.58(225/954)	35.80(242/676)	85.56(818/956)	95.92(800/834)	98.98(776/784)	100(792/792)
	3	32.82(256/780)	34.60(310/896)	88.24(780/884)	93.05(776/834)	99.50(800/804)	100(972/972)
	total	27.75(681/2454)	32.61(784/2404)	90.52(2502/2764)	93.30(2284/2448)	99.51(2416/2428)	100(2520/2520)
Control	1	2.06 (15/729)	2.86 (24/840)	3.19 (30/940)	5.56 (48/864)	4.30 (40/930)	4.76 (36/756)
	2	1.85 (16/864)	2 (14/700)	3.02 (24/796)	3.12 (26/834)	3.75 (36/960)	4.79 (48/1002)
	3	1.50 (12/800)	1.89 (14/740)	2.71 (24/882)	3.10 (28/902)	3.69 (34/922)	4.22 (40/948)
	total	1.80 (43/2393)	2.28 (52/2280)	2.98 (78/2618)	3.92 (102/2600)	3.91 (110/2812)	4.58 (124/2706)

جدول شماره ۵ : اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف عصاره گیاه افسنتین در مدت زمانهای مختلف مواجهه

میانگین مرگ و میر پروتواسکولکس ها پس از مدت زمان های مواجهه (درصد)							
غلظت (mg/ml)	آزمایشات	10 (min)	20 (min)	30 (min)	40 (min)	50 (min)	60 (min)
3	1	4.86(42/864)	6.85(60/876)	7.69(75/975)	9.09(90/990)	19.97(102/930)	15.44(120/777)
	2	5.81(57/981)	7.62(72/945)	7.69(66/858)	8.97(78/870)	11.11(111/999)	8.82(75/850)
	3	5.04(34/674)	6.35(48/756)	7.32(72/984)	7.14(60/840)	7.79(60/770)	8.13(60/738)
	total	5.28(133/2519)	6.98(180/2577)	7.56(213/2817)	8.44(228/2700)	10.11(273/2699)	10.78(255/2365)
5	1	6.33(60/948)	10.60(96/906)	10.76(88/818)	10.95(90/822)	13.46(105/780)	13.46(105/780)
	2	7.92(58/732)	11.43(100/875)	11.23(106/944)	10.59(102/963)	13.04(120/920)	19.86(168/846)
	3	7.75(60/774)	9.23(90/975)	4.92(36/732)	10.19(88/864)	12.56(104/828)	5.11(51/999)
	total	7.25(178/2454)	10.38(286/2756)	9.22(230/2494)	10.57(280/2648)	13.01(329/2528)	12.34(324/2625)
10	1	10.20(100/980)	12.01(120/999)	11.36(100/880)	11.48(105/915)	13.70(120/876)	29.26(275/940)
	2	11.59(114/984)	13.21(119/901)	13.70(114/832)	14.23(134/942)	15.42(148/960)	35.67(336/942)
	3	11.24(80/712)	12.47(96/770)	13.21(126/954)	14.08(120/852)	14.53(102/702)	32.63(248/760)
	total	10.99(294/2676)	12.55(335/2670)	12.75(340/2666)	13.25(359/2709)	14.58(370/2538)	32.51(859/2642)
25	1	16.08(138/858)	16.60(160/964)	17.11(116/678)	18.00(126/700)	20.84(158/758)	32.63(279/855)
	2	12.34(114/924)	19.88(165/830)	32.23(272/844)	32.50(260/800)	37.30(370/992)	36.85(314/852)
	3	12.07(105/870)	17.79(142/798)	31.19(252/808)	34.01(300/882)	34.48(320/928)	35.43(326/920)
	total	13.46(375/2652)	18.02(467/2592)	27.47(640/2330)	28.80(686/2382)	31.67(848/2678)	34/98(919/2627)
50	1	16.15(156/966)	17.43(152/872)	18.12(162/894)	20.64(180/872)	41.14(360/875)	44.72(445/995)
	2	25.00(210/840)	30.77(300/975)	42.86(396/924)	53.06(434/818)	54.71(418/764)	59.87(570/952)
	3	22.22(200/900)	30.12(300/996)	31.58(228/722)	44.20(404/914)	51.04(342/670)	53.11(392/738)
	total	20.92(566/2706)	26.45(752/2843)	30.94(786/2540)	39.09(1018/2604)	48.51(1120/2309)	52.53(1407/2685)
100	1	100(858/858)	100(930/930)	100(860/860)	100(840/840)	100(840/840)	100(855/855)
	2	100(742/742)	100(990/990)	100(824/824)	100(772/772)	100(820/820)	100(926/926)
	3	100(802/802)	100(900/900)	100(762/762)	100(796/796)	100(756/645)	100(784/784)
	total	100(2402/2402)	100(2820/2820)	100(2446/2446)	100(2408/2408)	100(2416/2416)	100(2565/2565)
Control	1	4.20 (40/952)	6.29 (42/668)	7.50(60/800)	8.26(72/872)	8.51(80/940)	9.73(75/771)
	2	2.88 (22/764)	4.17(40/960)	4.62(45/975)	4.99(38/762)	5.91(48/812)	6.94(50/720)
	3	2.73 (27/990)	4.11(32/778)	4.26(40/940)	4.28(36/842)	5.32(40/752)	5.60(46/822)
	total	3.29 (89/2706)	4.74(114/2406)	5.34(145/2715)	5.90(146/2476)	6.71(168/2504)	7.39(171/2313)

جدول شماره ۶: اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف اسانس گیاه رازیانه در مدت زمانهای مختلف مواجهه

میانگین مرگ و میر پروتواسکولکس ها پس از مدت زمان های مواجهه (درصد)							
غلظت (mg/ml)	آزمایشات	10 (min)	20 (min)	30 (min)	40 (min)	50 (min)	60 (min)
3	1	7.69(60/780)	7.89(60/760)	7.89(60/760)	8.13(69/849)	8.82(76/862)	8.52(78/916)
	2	7.91(66/834)	9.06(84/927)	9.06(84/927)	20.21(152/752)	10.79(90/834)	13.95(130/932)
	3	6.97(52/746)	8.58(76/886)	8.58(76/886)	10.70(82/766)	10.60(96/906)	11.86(92/776)
	total	7.54(178/2360)	8.55(220/2573)	8.55(220/2573)	12.80(303/2367)	10.70(262/2602)	11.43(300/2624)
5	1	4.34(32/738)	19.70(195/990)	20(150/750)	20.97(195/930)	21.15(162/766)	23.12(215/930)
	2	6.85(68/992)	18.21(177/972)	23.65(166/702)	22.79(186/816)	22.22(200/900)	27.93(238/852)
	3	7.46(54/724)	17.76(146/882)	13.01(130/999)	16.15(126/780)	22.58(168/744)	24.90(262/1052)
	total	6.28(154/2454)	18.61(518/2784)	18.20(446/2451)	20.07(507/2526)	21.99(530/2410)	25.23(715/2834)
10	1	35.24(351/996)	36(324/900)	42.83(400/934)	45(396/880)	47.66(346/726)	50(450/900)
	2	34.69(306/882)	37.97(300/790)	41.42(350/845)	47.64(404/8480)	65.81(462/702)	76.07(534/702)
	3	37.93(330/870)	37.38(342/915)	38.73(316/816)	46.13(346/750)	55.11(464/842)	73.71(684/928)
	total	35.92(987/2748)	37.08(966/2605)	41.08(1066/2595)	46.25(1146/2478)	56.04(1272/2270)	65.93(1668/2530)
25	1	94.77(870/918)	99.01(900/909)	99.18(970/978)	99.34(900/906)	99.50(800/804)	99.72(700/702)
	2	100(808/808)	100(826/826)	100(892/892)	100(978/978)	100(724/724)	100(782/782)
	3	100(993/993)	100(762/762)	100(840/840)	100(804/804)	100(872/872)	100(826/826)
	total	98.23(2671/2719)	99.64(2488/2497)	99.71(2702/2710)	99.78(2682/2688)	99.83(2396/2400)	99.91(2308/2310)
50	1	100(800/800)	100(930/930)	100(750/750)	100(960/960)	100(880/880)	100(890/890)
	2	100(870/870)	100(932/932)	100(776/776)	100(732/732)	100(922/922)	100(905/905)
	3	100(726/726)	100(794/794)	100(960/960)	100(982/982)	100(776/776)	100((897/897)
	total	100(2396/2396)	100(2656/2656)	100(2486/2486)	100(2674/2674)	100(2578/2578)	100(2692/2692)
100	1	100(890/890)	100(840/840)	100(833/833)	100(919/919)	100(998/998)	100(699/699)
	2	100(806/806)	100(798/798)	100(846/846)	100(899/899)	100(920/920)	100(699/699)
	3	100(863/863)	100(822/822)	100(800/800)	100(830/830)	100(873/873)	100(877/877)
	total	100(2559/2559)	100(2460/2460)	100(2479/2479)	100(2648/2648)	100(2791/2791)	100(2310/2310)
Control	1	0.69 (6/864)	3.26 (24/736)	5.57 (54/969)	5.66 (54/954)	5.94 (56/942)	6.97 (68/976)
	2	0.27 (2/754)	1.07(8/750)	1.99 (18/903)	2.58 (18/698)	4.04 (39/966)	5.59 (52/930)
	3	0.87(6/688)	1.43(14/976)	1.91 (14/743)	2.16 (18/834)	3.91 (32/818)	4 (36/900)
	total	0.61 (14/2306)	1.87 (46/2462)	3.30 (86/2606)	3.62 (90/2486)	4.66 (127/2726)	5.56 (156/2806)

جدول شماره ۷: اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف اسانس گیاه بومادران در مدت زمانهای مختلف مواجهه

میانگین مرگ و میر پروتواسکولکس ها پس از مدت زمان های مواجهه (درصد)

غلظت (mg/ml)	آزمایشات	10 (min)	20 (min)	30 (min)	40 (min)	50 (min)	60 (min)
3	1	21.01(162/771)	41.63(214/514)	68.18(600/880)	68.58(598/872)	70.23(630/897)	100(722/722)
	2	22.79(196/860)	41.63(214/514)	70(609/870)	72.88(602/826)	72.73(696.957)	100(802/802)
	3	22.87(220/962)	43.26(366/846)	71.92(548/762)	73.94(766/1036)	73.19(628/858)	100(776/776)
	total	22.29(578/2593)	42.35(914/2158)	69.94(1757/2512)	71.91(1966/2734)	72.05(1954/2712)	100(2300/2300)
5	1	37.18(264/710)	52.21(354/678)	71.24(540/758)	100(874/874)	100(700/700)	100(861/861)
	2	38.80(322/830)	53.45(434/812)	72.97(610/836)	100(642/642)	100(786/786)	100(826/826)
	3	38.93(320/822)	53.93(508/942)	73.37(584/796)	100(782/782)	100(836/836)	100(724/724)
	total	38.36(906/2362)	53.29(1296/2432)	72.55(1734/2390)	100(2298/2298)	100(2322/2322)	100(2411/2411)
10	1	67.63(633/936)	88.80(666/750)	94.88(742/782)	100(906/906)	100(830/830)	100(963/963)
	2	68.97(698/1012)	89.47(680/760)	96.22(712/740)	100(842/842)	100(750/750)	100(974/974)
	3	69.21(670/968)	90.23(462/512)	97.51(782/802)	100(754/754)	100(870/870)	100(766/766)
	total	69.21(670/968)	89.42(1808/2022)	96.21(2236/2324)	100(2502/2502)	100(2450/2450)	100(2703/2703)
25	1	100(700/700)	100(760/760)	100(712/712)	100(923/923)	100(758/758)	100(866/866)
	2	100(782/782)	100(798/798)	100(834/834)	100(879/879)	100(788/788)	100(799/799)
	3	100(840/840)	100(944/944)	100(730/730)	100(955/955)	100(804/804)	100(833/833)
	total	100(2322/2322)	100(2502/2502)	100(2276/2276)	100(2757/2757)	100(2350/2350)	100(833/833)
50	1	100(776/776)	100(836/836)	100(885/885)	100(878/878)	100(898/898)	100(768/768)
	2	100(816/816)	100(982/982)	100(766/766)	100(767/767)	100(879/879)	100(845/845)
	3	100(826/826)	100(784/784)	100 (894/894)	100(980/980)	100(969/969)	100(932/932)
	total	100(2396/2396)	100(2602/2602)	100(2545/2545)	100(2625/2625)	100(2746/2746)	100(2545/2545)
100	1	100(730/730)	100(762/762)	100(813/813)	100(944/944)	100(743/743)	100(941/941)
	2	100(846/846)	100(696/696)	100(933/933)	100(875/875)	100(854/854)	100(893/893)
	3	100(911/911)	100(842/842)	100(834/834)	100(925/925)	100(788/788)	100(999/999)
	total	100(2487/2487)	100(2300/2300)	100(2580/2580)	100(2744/2744)	100(2385/2385)	100(2833/2833)
Control	1	1.46(10/686)	1.58(10/634)	2.52(24/951)	2.60(18/693)	2.67(20/748)	2.81(20/712)
	2	2.48(20/808)	2.56(26/1016)	3.16(30/948)	3.38(26/770)	3.65(30/822)	4.04(30/742)
	3	2.80(24/858)	2.63(22/836)	3.24(30/927)	3.53(30/850)	3.88(30/774)	4.26(42/986)
	total	2.30(18/2352)	2.33(58/2486)	2.97(84/2826)	3.20(74/2313)	3.41(80/2344)	3.77(92/2440)

جدول شماره ۸: اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف اسانس گیاه اکالیپتوس در مدت زمانهای مختلف مواجهه

میانگین مرگ و میر پروتواسکولکس ها پس از مدت زمان های مواجهه (درصد)							
غلظت (mg/ml)	آزمایشات	10 (min)	20 (min)	30 (min)	40 (min)	50 (min)	60 (min)
3	1	9.09(75/825)	11.11(90/810)	11.35(104/916)	14.67(132/900)	15.97(114/714)	16.02(148/924)
	2	8.61(68/790)	11.08(76/686)	11.08(108/975)	11.73(106/904)	13.96(98/702)	15.97(122/764)
	3	8.05(66/820)	10.64(76/714)	11.06(100/904)	11.69(114/975)	14.18(114/804)	16.06(132/822)
	total	8.58(209/2435)	10.95(242/2210)	11.16(312/2795)	12.67(352/2779)	14.69(326/2220)	16.02(402/2510)
5	1	17.43(114/654)	33.85(264/780)	39.81(344/864)	40(372/930)	41.67(315/756)	57.72(516/894)
	2	16.09(112/696)	34.56(244/706)	38.83(320/824)	40.35(280/694)	39.87(366/918)	55.86(448/802)
	3	15.58(134/860)	32.03(278/868)	38.04(264/694)	38.83(320/824)	39.16(390/996)	44.54(302/678)
	total	16.29(360/2210)	33.39(786/2354)	38.96(928/2382)	39.71(972/2448)	40.11(1071/2670)	53.33(1266/2374)
10	1	100(868/868)	100(975/975)	100(955/955)	100(856/856)	100(810/810)	100(880/880)
	2	100(920/920)	100(892/892)	100(696/696)	100(836/836)	100(814/814)	100(716/716)
	3	100(902/902)	100(950/950)	100(842/842)	100(706/706)	100(780/780)	100(778/778)
	total	100(2690/2690)	100(2817/2817)	100(2493/2493)	100(2398/2398)	100(2404/2404)	100(2374/2374)
25	1	100(955/955)	100(860/860)	100(900/900)	100(930/930)	100(804/804)	100(960/960)
	2	100(840/840)	100(838/838)	100(810/810)	100(992/992)	100(850/850)	100(790/790)
	3	100(720/720)	100(854/854)	100(776/776)	100(784/784)	100(778/778)	100(832/832)
	total	100(2515/2515)	100(2552/2552)	100(2486/2486)	100(2706/2706)	100(2432/2432)	100(2582/2582)
50	1	100(699/699)	100(776/776)	100(822/822)	100(798/798)	100(888/888)	100(900/900)
	2	100(780/780)	100(865/865)	100(902/902)	100(866/866)	100(756/756)	100(877/877)
	3	100(801/801)	100(766/766)	100(890/890)	100(789/789)	100(723/723)	100(846/846)
	total	100(2280/2280)	100(2407/2407)	100(2614/2614)	100(2453/2453)	100(2367/2367)	100(2623/2623)
100	1	100(873/873)	100(996/996)	100(735/735)	100(999/999)	100(799/799)	100(699/699)
	2	100(703/703)	100(895/895)	100(800/800)	100(930/930)	100(966/966)	100(788/788)
	3	100(789/789)	100(919/919)	100(859/859)	100(877/877)	100(867/867)	100(873/873)
	total	100(2365/2365)	100(2757/2757)	100(2394/2394)	100(2806/2806)	100(2632/2632)	100(2360/2360)
Control	1	4.20(30/714)	5.06(40/790)	5.30(42/792)	8.93(75/840)	9.28(66/711)	9.95(80/804)
	2	3.01(24/798)	4.90(38/776)	5.18(40/772)	6.75(66/978)	7.94(54/680)	8.28(72/870)
	3	2.44(20/818)	4.76(40/840)	5.04(50/992)	7.11(58/816)	7.80(64/820)	8.06(75/930)
	total	3.18(74/2330)	4.90(118/2406)	5.16(132/2556)	7.55(199/2634)	8.32(184/2211)	8.72(227/2604)

جدول شماره ۹: اثر پروتواسکولیسیدال غلظتهای مختلف عصاره گیاه سرخارگل در مدت زمانهای مختلف مواجهه

میانگین مرگ و میر پروتواسکولکس ها پس از مدت زمان های مواجهه (درصد)							
غلظت (mg/ml)	آزمایشات	10 (min)	20 (min)	30 (min)	40 (min)	50 (min)	60 (min)
3	1	14.97(132/882)	21.36(188/880)	35.90(336/936)	36.22(268/740)	37.29(339/909)	39.94(274/686)
	2	13.49(119/882)	20.73(204/984)	33.67(266/790)	35.14(298/848)	36.39(333/915)	39.54(276/698)
	3	11.32(90/795)	21.62(200/925)	32.50(260/800)	33.86(258/762)	36.18(356/984)	38.27(310/810)
	total	13.33(341/2559)	21.23(592/2789)	34.12(862/2526)	35.06(824/2350)	36.61(1028/2808)	39.20(860/2194)
5	1	69.19(595/860)	74.92(708/945)	88.47(783/885)	100(764/764)	100(722/722)	100(963/963)
	2	68.05(592/870)	76.66(578/754)	85.75(602/702)	100(674/674)	100(744/744)	100(892/892)
	3	70.00(560/800)	76.23(680/892)	82.89(756/912)	100(804/804)	100(765/765)	100(805/805)
	total	69.05(1747/2530)	75.88(1966/2591)	85.67(2141/2499)	100(2242/2242)	100(2231/2231)	100(2660/2660)
10	1	100(818/818)	100(740/740)	100(945/945)	100(918/918)	100(752/752)	100(908/908)
	2	100(900/900)	100(730/730)	100(924/924)	100(912/912)	100(768/768)	100(756/756)
	3	100(896/896)	100(935/935)	100(939/939)	100(818/818)	100(920/920)	100(708/708)
	total	100(2614/2614)	100(2405/2405)	100(2817/2817)	100(2648/2648)	100(2440/2440)	100(2372/2372)
25	1	100(722/722)	100(746/746)	100(774/774)	100(818/818)	100(862/862)	100(752/752)
	2	100(890/890)	100(810/810)	100(742/742)	100(912/912)	100(972/972)	100(834/834)
	3	100(972/972)	100(920/920)	100(890/890)	100(875/875)	100(872/872)	100(798/798)
	total	100(2584/2584)	100(2476/2476)	100(2406/2406)	100(2605/2605)	100(2706/2706)	100(2384/2384)
50	1	100(898/898)	100(710/710)	100(726/726)	100(933/933)	100(832/832)	100(798/798)
	2	100(882/882)	100(987/987)	100(794/794)	100(792/792)	100(920/920)	100(718/718)
	3	100(825/825)	100(753/753)	100(835/835)	100(964/964)	100(831/831)	100(702/702)
	total	100(2605/2605)	100(2450/2450)	100(2355/2355)	100(2689/2689)	100(2583/2583)	100(2218/2218)
100	1	100(870/870)	100(876/876)	100(972/972)	100(730/730)	100(828/828)	100(835/835)
	2	100(938/938)	100(852/852)	100(724/724)	100(702/702)	100(916/916)	100(914/914)
	3	100(915/915)	100(840/840)	100(795/795)	100(820/820)	100(740/740)	100(854/854)
	total	100(2723/2723)	100(2568/2568)	100(2491/2491)	100(820/820)	100(2484/2484)	100(3499/3499)
Control	1	2.77 (24/866)	2.88 (260/902)	2.92 (24/822)	3.39 (26/768)	2.96 (24/812)	4.68 (46/982)
	2	2.71 (26/958)	2.87 (280/974)	3.00 (26/866)	3.42 (24/702)	3.75 (28/746)	4.09 (34/832)
	3	3.57 (30/840)	3.60 (27/750)	5.36 (45/837)	5.72 (51/891)	6.13 (52/848)	6.85 (60/876)
	total	3 (80/2664)	3.11 (567/2626)	3.76 (95/2525)	4.28 (101/2361)	4.32 (104/2406)	5.20 (140/2690)

جدول شماره ۱۰: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml اسانس اکالیپتوس بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های مختلف

مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)				تعداد تست	مدت زمان های مواجهه
۴	۳	۲	۱		
			۸/۶۰	۳	۱۰ دقیقه
		۱۰/۹۵	۱۰/۹۵	۳	۲۰ دقیقه
		۱۱/۲۰		۳	۳۰ دقیقه
	۱۲/۷۰	۱۲/۷۰		۳	۴۰ دقیقه
۱۴/۷۰	۱۴/۷۰			۳	۵۰ دقیقه
۱۶/۰۱				۳	۶۰ دقیقه
۰/۴۷	۰/۱۲	۰/۲۰	۰/۰۵	۳	p-value

جدول شماره ۱۱: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml اسانس اکالیپتوس بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)			تعداد تست	مدت زمان های مواجهه
۳	۲	۱		
		۱۶/۴۰	۳	۱۰ دقیقه
	۳۳/۵۰		۳	۲۰ دقیقه
	۳۸/۹۰		۳	۳۰ دقیقه
	۳۹/۷۳		۳	۴۰ دقیقه
	۴۰/۲۳		۳	۵۰ دقیقه
۵۲/۷۱			۳	۶۰ دقیقه
۱/۰۰۰	۰/۱۵	۱/۰۰۰	۳	p-value

جدول شماره ۱۲: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml اسانس رازیانه بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های مختلف

مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)		تعداد تست	مدت زمان های مواجهه
۲	۱		
	۲/۰۳	۳	۱۰ دقیقه
۷/۵۳	۷/۵۳	۳	۲۰ دقیقه
۸/۵۱	۸/۵۱	۳	۳۰ دقیقه
۱۰/۰۷		۳	۵۰ دقیقه
۱۱/۴۴		۳	۶۰ دقیقه
۱۳/۰۲		۳	۴۰ دقیقه
۰/۲۶	۰/۱۴	۳	p-value

جدول شماره ۱۳: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml اسانس رازیانه روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های مختلف

مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)		تعداد تست	مدت زمان های مواجهه
۲	۱		
	۶/۲۲	۳	۱۰ دقیقه
۱۸/۵۶		۳	۲۰ دقیقه
۱۸/۸۷		۳	۳۰ دقیقه
۱۹/۹۷		۳	۴۰ دقیقه
۲۱/۹۸		۳	۵۰ دقیقه
۲۵/۳۲		۳	۶۰ دقیقه
۰/۱۲	۱/۰۰۰	۳	p-value

جدول شماره ۱۴: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰ mg/ml اسانس رازیانه بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)			مدت زمان های مواجهه
	۱	۲	۳	
۳	۳۵/۹۶			۱۰ دقیقه
۳	۳۷/۱۲	۳۷/۱۲		۲۰ دقیقه
۳	۴۰/۹۹	۴۰/۹۹		۳۰ دقیقه
۳	۴۶/۲۶	۴۶/۲۶		۴۰ دقیقه
۳		۵۶/۱۹	۵۶/۱۹	۵۰ دقیقه
۳			۶۶/۵۹	۶۰ دقیقه
۳	۰/۵۱	۰/۰۵	۰/۵۱	p-value

جدول شماره ۱۵: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۲۵ mg/ml اسانس رازیانه بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های مختلف

مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)		مدت زمان های مواجهه
	۱		
۳	۹۸/۲۶		۱۰ دقیقه
۳	۹۹/۶۷		۲۰ دقیقه
۳	۹۹/۷۳		۳۰ دقیقه
۳	۹۹/۷۸		۴۰ دقیقه
۳	۹۹/۸۴		۵۰ دقیقه
۳	۹۹/۹۱		۶۰ دقیقه
۳	۰/۶۳		p-value

جدول شماره ۱۶: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml اسانس بومادران بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)				تعداد تست	مدت زمان های مواجهه
۴	۳	۲	۱		
			۲۲/۲۳	۳	۱۰ دقیقه
		۴۲/۲۵		۳	۲۰ دقیقه
	۷۰/۰۳			۳	۳۰ دقیقه
	۷۱/۸۰			۳	۴۰ دقیقه
	۷۲/۰۵			۳	۵۰ دقیقه
۱۰۰				۳	۶۰ دقیقه
۱۰۰	۰/۶۷	۱۰۰	۱۰۰	۳	p-value

جدول شماره ۱۷: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml اسانس بومادران بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)				تعداد تست	مدت زمان های مواجهه
۴	۳	۲	۱		
			۳۸/۳۰	۳	۱۰ دقیقه
		۵۳/۲۰		۳	۲۰ دقیقه
	۷۲/۵۳			۳	۳۰ دقیقه
۱۰۰				۳	۴۰ دقیقه
۱۰۰				۳	۵۰ دقیقه
۱۰۰				۳	۶۰ دقیقه
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۳	p-value

جدول شماره ۱۸: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰ mg/ml اسانس بومادران بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)				تعداد تست	مدت زمان های مواجهه
۴	۳	۲	۱		
			۶۸/۶۱	۳	۱۰ دقیقه
		۸۹/۵۰		۳	۲۰ دقیقه
	۹۶/۲۰			۳	۳۰ دقیقه
۱۰۰				۳	۴۰ دقیقه
۱۰۰				۳	۵۰ دقیقه
۱۰۰				۳	۶۰ دقیقه
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۳	p-value

جدول شماره ۱۹: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml عصاره گردو بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های مختلف

مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)				تعداد تست	مدت زمان های مواجهه
۴	۳	۲	۱		
			۴/۷۷	۳	۱۰ دقیقه
			۵/۵۴	۳	۲۰ دقیقه
		۶/۹۷		۳	۳۰ دقیقه
	۱۲/۷۱			۳	۴۰ دقیقه
	۱۲/۸۹			۳	۵۰ دقیقه
۱۶/۴۱				۳	۶۰ دقیقه
۱۰۰	۰/۹۹	۱۰۰	۰/۲۳	۳	p-value

جدول شماره ۲۰: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml عصاره گردو بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های مختلف

مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)			مدت زمان های مواجهه
	۱	۲	۳	
۳	۵/۶۱			۱۰ دقیقه
۳	۶/۷۴			۲۰ دقیقه
۳	۷/۵۸			۳۰ دقیقه
۳		۱۴/۰۹		۴۰ دقیقه
۳		۱۴/۹۰		۵۰ دقیقه
۳			۱۸/۵۶	۶۰ دقیقه
۳	۰/۱۳	۰/۸۵	۱۰۰	p-value

جدول شماره ۲۱: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰ mg/ml عصاره گردو بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)				مدت زمان های مواجهه
	۱	۲	۳	۴	
۳	۹/۲۲				۱۰ دقیقه
۳	۹/۶۱				۲۰ دقیقه
۳	۹/۸۰				۳۰ دقیقه
۳		۱۳/۸۵			۴۰ دقیقه
۳			۱۷/۵۹		۵۰ دقیقه
۳				۱۹/۸۷	۶۰ دقیقه
۳	۰/۹۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	p-value

جدول شماره ۲۲: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۲۵ mg/ml عصاره گردو بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)				مدت زمان مواجهه
	۴	۳	۲	۱	
۳				۱۱/۶۵	۱۰ دقیقه
۳			۱۴/۰۲	۱۴/۰۲	۲۰ دقیقه
۳			۱۴/۷۷		۳۰ دقیقه
۳		۱۸/۰۳			۴۰ دقیقه
۳	۲۱/۹۸				۵۰ دقیقه
۳	۲۱/۹۹				۶۰ دقیقه
۳	۱۰۰	۱۰۰	۰/۹۱	۰/۰۷	p-value

جدول شماره ۲۳: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵۰ mg/ml عصاره گردو بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)				مدت زمان مواجهه
	۴	۳	۲	۱	
۳				۱۲/۴۵	۱۰ دقیقه
۳			۱۴/۴۰	۱۴/۴۰	۲۰ دقیقه
۳			۱۵/۴۵		۳۰ دقیقه
۳		۲۳/۴۵			۵۰ دقیقه
۳		۲۳/۸۰			۴۰ دقیقه
۳	۲۶/۴۹				۶۰ دقیقه
۳	۱۰۰	۰/۹۹	۰/۷۶	۰/۲۰	p-value

جدول شماره ۲۴: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره گردو بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

مدت زمان های مواجهه	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)	
		۱	۲
۱۰ دقیقه	۳	۲۸/۰۶	
۲۰ دقیقه	۳	۳۲/۷۶	
۳۰ دقیقه	۳		۹۰/۵۵
۴۰ دقیقه	۳		۹۳/۲۵
۵۰ دقیقه	۳		۹۹/۴۹
۶۰ دقیقه	۳		۱۰۰
p-value	۳	۰/۰۹	۰/۶۷

جدول شماره ۲۵: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml عصاره سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

مدت زمان های مواجهه	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)			
		۱	۲	۳	۴
۱۰ دقیقه	۳	۱۳/۲۶			
۲۰ دقیقه	۳		۲۱/۲۴		
۳۰ دقیقه	۳			۳۴/۰۲	
۴۰ دقیقه	۳			۳۵/۰۷	
۵۰ دقیقه	۳			۳۶/۶۲	۳۶/۶۲
۶۰ دقیقه	۳				۳۹/۲۵
p-value	۳	۱۰۰	۱۰۰	۰/۱۷	۰/۱۷

جدول شماره ۲۶: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml عصاره سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)				مدت زمان مواجهه
	۱	۲	۳	۴	
۳	۱۶/۰۸				۱۰ دقیقه
۳		۷۵/۹۴			۲۰ دقیقه
۳			۸۵/۷۱		۳۰ دقیقه
۳				۱۰۰	۴۰ دقیقه
۳				۱۰۰	۵۰ دقیقه
۳				۱۰۰	۶۰ دقیقه
۳	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	p-value

جدول شماره ۲۷: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml عصاره افسنطین بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)		مدت زمان مواجهه
	۱	۲	
۳	۵/۲۴		۱۰ دقیقه
۳	۶/۹۴	۶/۹۴	۲۰ دقیقه
۳	۷/۵۷	۷/۵۷	۳۰ دقیقه
۳	۸/۴۰	۸/۴۰	۴۰ دقیقه
۳	۹/۹۶	۹/۹۶	۵۰ دقیقه
۳		۱۰/۸۰	۶۰ دقیقه
۳	۰/۰۹	۰/۲۰	p-value

جدول شماره ۲۸: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml عصاره افسنطین بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

مدت زمان های مواجهه	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)
		۱
۱۰ دقیقه	۳	۷/۳۳
۲۰ دقیقه	۳	۸/۹۷
۳۰ دقیقه	۳	۱۰/۴۲
۴۰ دقیقه	۳	۱۰/۵۸
۶۰ دقیقه	۳	۱۲/۸۱
۵۰ دقیقه	۳	۱۳/۰۲
p-value	۳	۰/۳۷

جدول شماره ۲۹: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰ mg/ml عصاره افسنطین بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

مدت زمان های مواجهه	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)	
		۱	۲
۱۰ دقیقه	۳	۱۱/۰۱	
۲۰ دقیقه	۳	۱۲/۵۶	
۳۰ دقیقه	۳	۱۲/۷۶	
۴۰ دقیقه	۳	۱۳/۲۶	
۵۰ دقیقه	۳	۱۴/۵۵	
۶۰ دقیقه	۳		۳۲/۵۲
p-value	۳	۰/۱۵	۱۰۰

جدول شماره ۳۰: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰ mg/ml عصاره افسنطین بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

مدت زمان های مواجهه	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)	
		۱	۲
۱۰ دقیقه	۳	۱۳/۵۰	
۲۰ دقیقه	۳	۱۸/۰۹	۱۸/۰۹
۳۰ دقیقه	۳	۲۶/۸۴	۲۶/۸۴
۴۰ دقیقه	۳	۲۸/۱۷	۲۸/۱۷
۵۰ دقیقه	۳		۳۰/۸۶
۶۰ دقیقه	۳		۳۴/۹۷
p-value	۳	۰/۱۲	۰/۰۶

جدول شماره ۳۱: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵۰ mg/ml عصاره افسنطین بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

مدت زمان های مواجهه	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)	
		۱	۲
۱۰ دقیقه	۳	۲۱/۱۲	
۲۰ دقیقه	۳	۲۶/۱۱	۲۶/۱۱
۳۰ دقیقه	۳	۳۰/۸۵	۳۰/۸۵
۴۰ دقیقه	۳	۳۹/۳۰	۳۹/۳۰
۵۰ دقیقه	۳	۴۸/۹۷	۴۸/۹۷
۶۰ دقیقه	۳		۵۲/۳۰
p-value	۳	۰/۱۱	۰/۰۸

جدول شماره ۳۲: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره افسنتین بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey(درصد)

مدت زمان های مواجهه	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)
		۱
۱۰ دقیقه	۳	۱۰۰/۰۰
۲۰ دقیقه	۳	۱۰۰/۰۰
۳۰ دقیقه	۳	۱۰۰/۰۰
۴۰ دقیقه	۳	۱۰۰/۰۰
۶۰ دقیقه	۳	۱۰۰/۰۰
۵۰ دقیقه	۳	۱۰۰/۰۰
p-value	۳	۰/۷۷۹

جدول شماره ۳۳: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۳ mg/ml عصاره آزاد درخت بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های مختلف

مواجهه با استفاده از تست Tukey(درصد)

مدت زمان های مواجهه	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)		
		۱	۲	۳
۱۰ دقیقه	۳	۲/۴۷		
۲۰ دقیقه	۳	۲/۹۸	۲/۹۸	
۳۰ دقیقه	۳	۳/۶۶	۳/۶۶	۳/۶۶
۴۰ دقیقه	۳		۴/۲۲	۴/۲۲
۵۰ دقیقه	۳		۴/۰۵	۴/۰۵
۶۰ دقیقه	۳			۴/۷۰
p-value	۳	۰/۱۲	۰/۹۳	۰/۱۹

جدول شماره ۳۴: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵ mg/ml عصاره آزاد درخت بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)			مدت زمان مواجهه
	۱	۲	۳	
۳	۳/۳۸			۱۰ دقیقه
۳	۳/۸۱			۲۰ دقیقه
۳	۴/۲۰	۴/۲۰		۳۰ دقیقه
۳	۴/۵۸	۴/۵۸		۴۰ دقیقه
۳		۵/۵۴	۵/۵۴	۵۰ دقیقه
۳			۶/۸۰	۶۰ دقیقه
۳	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۱۴	p-value

جدول شماره ۳۵: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰ mg/ml عصاره آزاد درخت بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های مختلف

مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)			مدت زمان مواجهه
	۱	۲	۳	
۳	۳/۴۵			۱۰ دقیقه
۳	۴/۱۳	۴/۱۳		۲۰ دقیقه
۳	۴/۸۳	۴/۸۳	۴/۸۳	۳۰ دقیقه
۳	۵/۴۴	۵/۴۴	۵/۴۴	۴۰ دقیقه
۳		۶/۷۵	۶/۷۵	۵۰ دقیقه
۳			۷/۴۳	۶۰ دقیقه
۳	۰/۲۱	۰/۰۶	۰/۰۶	p-value

جدول شماره ۳۶: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۲۵ mg/ml عصاره آزاد درخت بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

مدت زمان های مواجهه	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)	
		۱	۲
۱۰ دقیقه	۳	۴/۰۸	
۲۰ دقیقه	۳	۴/۳۸	
۳۰ دقیقه	۳	۴/۹۹	
۴۰ دقیقه	۳	۵/۱۹	
۵۰ دقیقه	۳		۸/۸۵
۶۰ دقیقه	۳		۹/۵۱
p-value	۳	۰/۵۵	۰/۹۰۰

جدول شماره ۳۷: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۵۰ mg/ml عصاره آزاد درخت بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان های

مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

مدت زمان های مواجهه	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)		
		۱	۲	۳
۱۰ دقیقه	۳	۵/۰۶		
۲۰ دقیقه	۳	۵/۶۷		
۳۰ دقیقه	۳	۵/۸۲		
۴۰ دقیقه	۳	۶/۲۴		
۵۰ دقیقه	۳		۹/۵۵	
۶۰ دقیقه	۳			۱۳/۲۸
p-value	۳	۰/۲۲	۱۰۰	۱۰۰

جدول شماره ۳۸: جدول مقایسه ای اثر غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره آزاد درخت بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان

های مختلف مواجهه با استفاده از تست Tukey (درصد)

گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$)				تعداد تست	مدت زمان های مواجهه
۴	۳	۲	۱		
			۸/۱۷	۳	۱۰ دقیقه
		۱۴/۸۲	۱۴/۸۲	۳	۲۰ دقیقه
		۱۸/۴۳		۳	۳۰ دقیقه
	۲۱/۱۰	۲۱/۱۰		۳	۴۰ دقیقه
۲۹/۰۲	۲۹/۰۲			۳	۵۰ دقیقه
۲۹/۷۴				۳	۶۰ دقیقه
۱۰۰	۰/۰۷	۰/۱۹	۰/۱۶	۳	p-value

نتایج اثرات ایمونومدولاتوری گیاهان دارویی بر مارکرهای بلوغ سلول

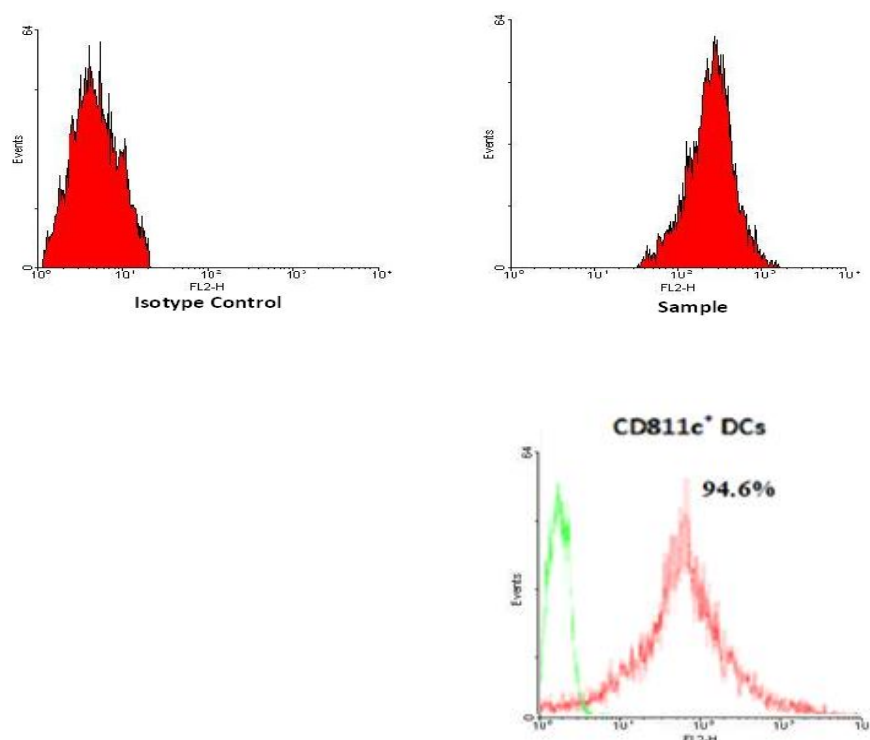
دندریتیک

نتایج حاصل از تخلیص سلول $CD811c^+$ DCs

نتایج فلوسیتومتری جداسازی سلول $CD811c^+$ DCs با روش بید مغناطیسی

بعد از جداسازی، سلول ها با آنتی بادیهای فلورسنت شامل anti- $CD11c$ (PE-conjugated) و isotype-matched controls رنگ آمیزی و با دستگاه فلوسیتومتری قرائت گردید. نتایج

نشان دادند که سلول دندریتیک با خلوص $94.6 \pm 1/2$ درصد جداسازی شدند (شکل ۷)

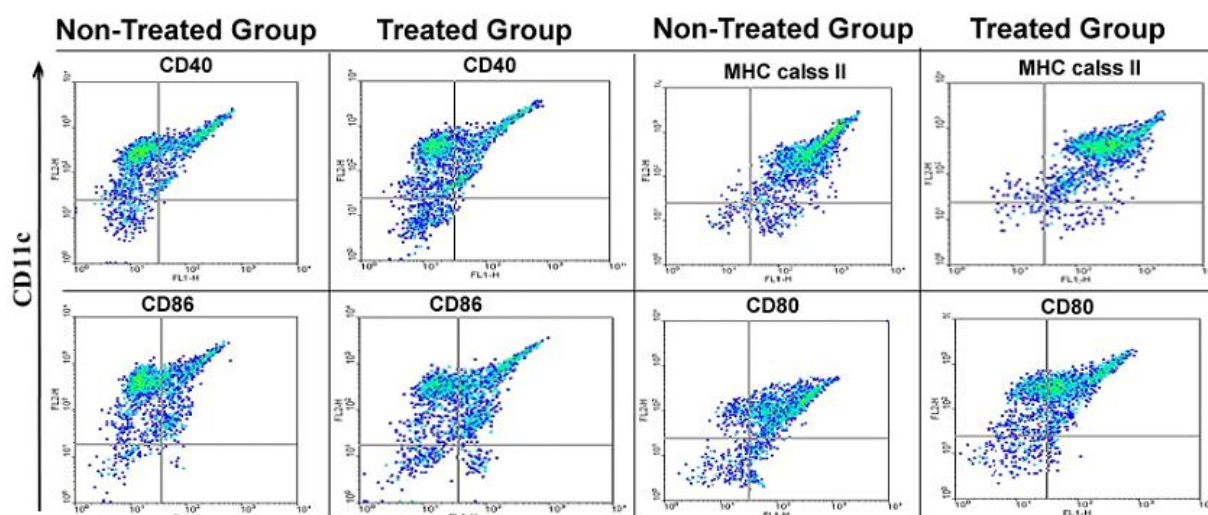


تصویر شماره (۷): فلوسیتومتری درصد خلوص سلول $CD811c^+$ DCs

سلول های دندریتیک بعد از جداسازی با بید مغناطیسی با آنتی بادیهای منوکلونال فلورسنت و ایزوتیپ کنترل رنگ آمیزی شدند. نمونه ای از نمودار فلوسیتومتری سلول های دندریتیک با مارکرهای مثبت از لحاظ $CD11c^{+}$ با درجه خلوص 94.6 ± 1.2 نشان داده شده است. نمودار رنگ قرمز: نمونه سلول های دندریتیک جدا شده و نمودار رنگ سبز: ایزوتیپ کنترل. نتایج حاصل میانگین حداقل سه بار آزمایش جداگانه به صورت تکرار دوتایی بوده است.

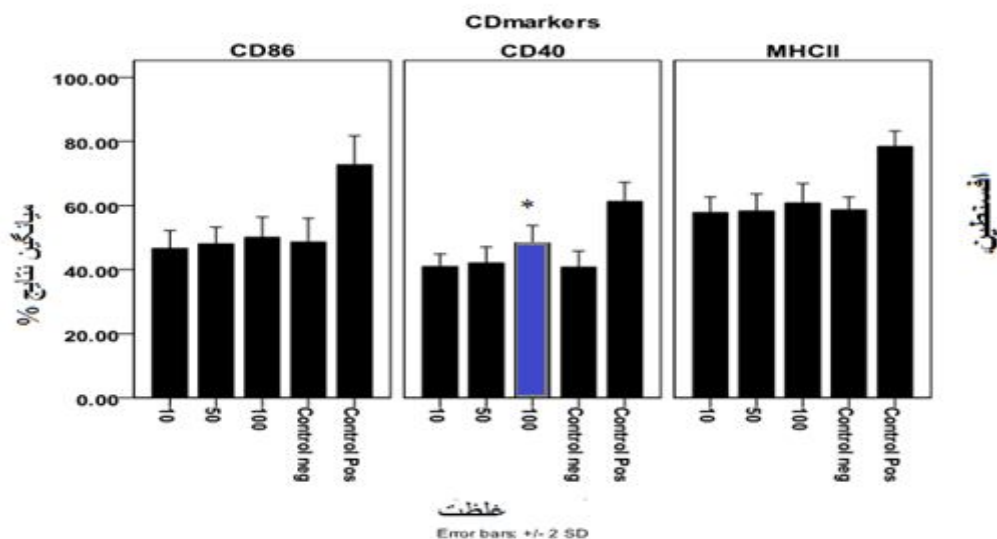
نتایج فلوسیتومتری مارکرهای بلوغ سلول $CD811c^{+}$ DCs بعد از کشت با عصاره یا اسانس گیاهان

در تصویر زیر نمونه ای از نتایج فلوسیتومتری درصد بروز مارکرهای بلوغ در سطح سلول ها بعد از کشت سلولی و مواجهه با عصاره یا اسانس گیاهان نشان داده شد.



تصویر شماره (۸): نمونه نتایج فلوسیتومتری بروز مارکرهای بلوغ

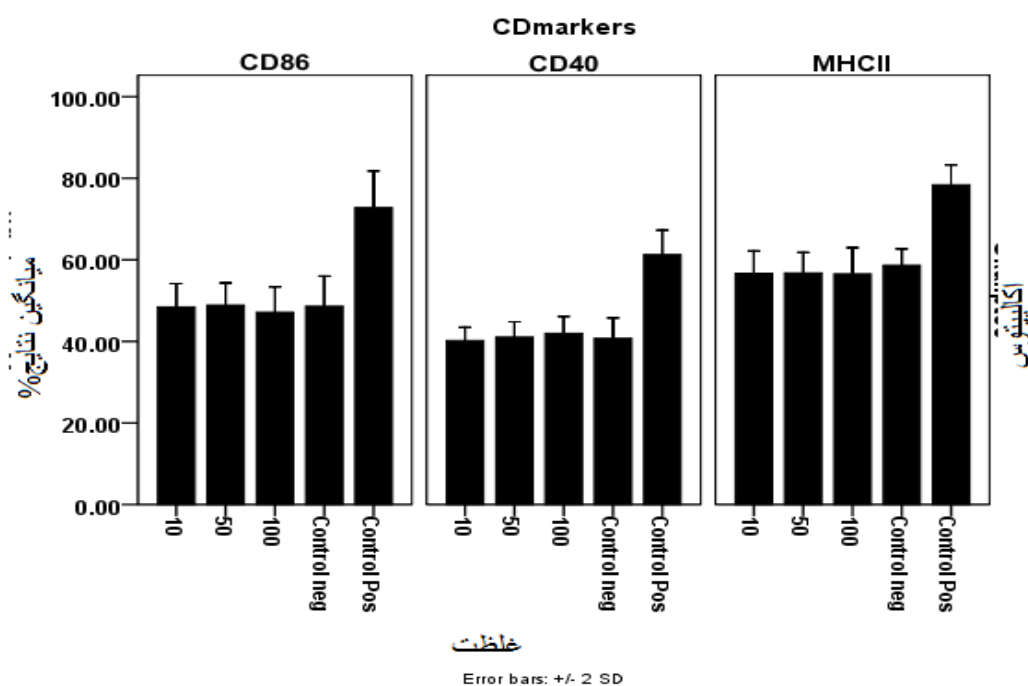
نتایج نشان داد که اثر عصاره اتانولی افسنطین بر روی مارکرهای CD86، CD40 و MHCII در غلظت ۱۰۰ µg/ml بیشترین اثر را در جهت افزایش این سه مارکر در سطح سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای داشت. این نتایج نشان دادند که افزایش دو مارکر CD86 و MHCII از لحاظ آماری معنی دار نبوده است. اما آنالیز نتایج آماری نشان داد که عصاره اتانولی افسنطین در مقایسه با کنترل منفی سبب افزایش معنی داری در غلظت ۱۰۰ µg/ml در سطح سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای شده است ($P < 0.05$). لذا می توان نتیجه گرفت که این گیاه با خواص ایمنومدولاتوری سبب افزایش معنی دار بیان CD40 سطح سلول می گردد. علاوه بر آن گروه کنترل مثبت که با LPS مواجه شدند نسبت به کنترل منفی (فقط محیط کشت) سبب افزایش معنی دار تمام مارکرها شدند ($P < 0.05$).



تصویر شماره (۹): نتایج تاثیر غلظتهای مختلف عصاره افسنطین بر مارکرهای سطحی بلوغ سلولهای عرضه کننده

حرفه ای آنتی ژن

آنالیز اثر اسانس اتانولی گیاه اکالیپتوس به روی سه مارکر مورد بررسی نشان داد که اثر این اسانس در غلظت پایین تر ($10 \mu\text{g/ml}$) بر مارکهای CD86، CD40 و MHCII اثر کاهشی داشت. این اسانس در غلظتهای $50 \mu\text{g/ml}$ و $100 \mu\text{g/ml}$ بر مارکر MHCII اثر کاهشی و بر CD86 و CD40 اثر افزایشی داشت اما این اثر معنی دار نبود. همین طور آنالیز آماری نشان داد که گروه کنترل مثبت مواجه شده با LPS به نسبت کنترل منفی سبب افزایش معنی دار تمام مارکها شدند ($P < 0.05$).



تصویر شماره (۱۰): نتایج تاثیر غلظتهای مختلف اسانس اکالیپتوس بر مارکهای سطحی بلوغ سلولهای عرضه کننده

حرفه ای آنتی ژن

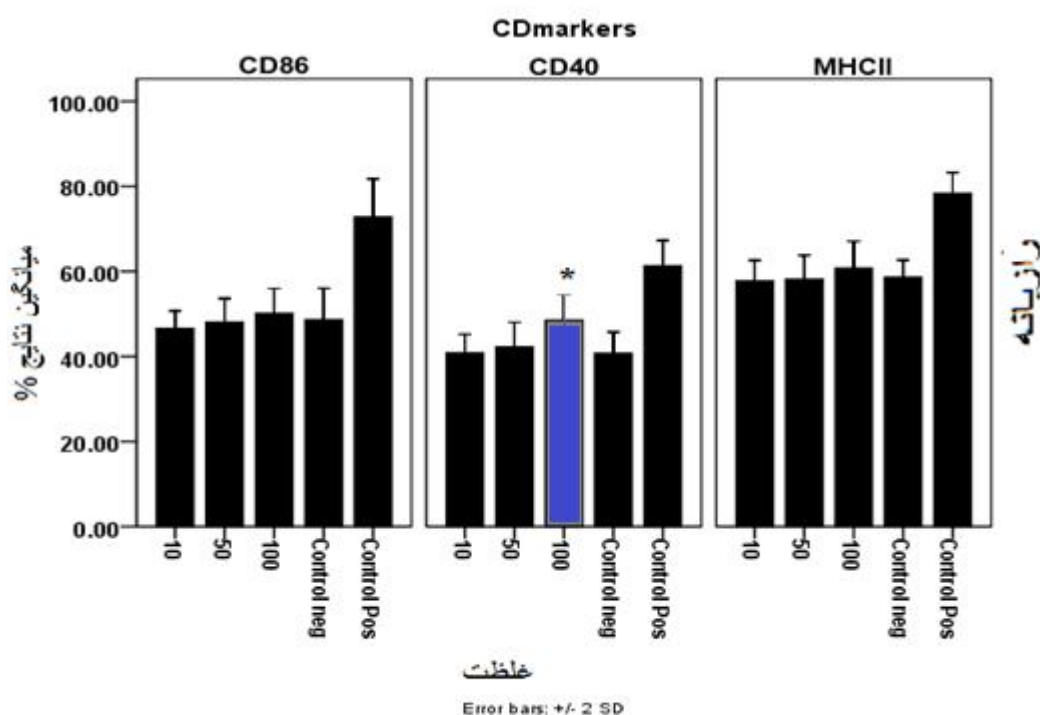
اسانس اتانولی رازیانه در غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ و 50 بر روی هر سه مارکر اثر کاهشی داشت، اما در

غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ اثر افزایشی روی مارکرهاي مورد بررسی نشان داد که این اثر در غلظت

$100 \mu\text{g/ml}$ برای مارکر CD40 معنا دار بود ($P < 0.05$). گروه کنترل مثبت سبب افزایش معنا دار

تمامی مارکهای سلول های عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن در مقایسه با کنترل منفی شدند

($P < 0.05$).

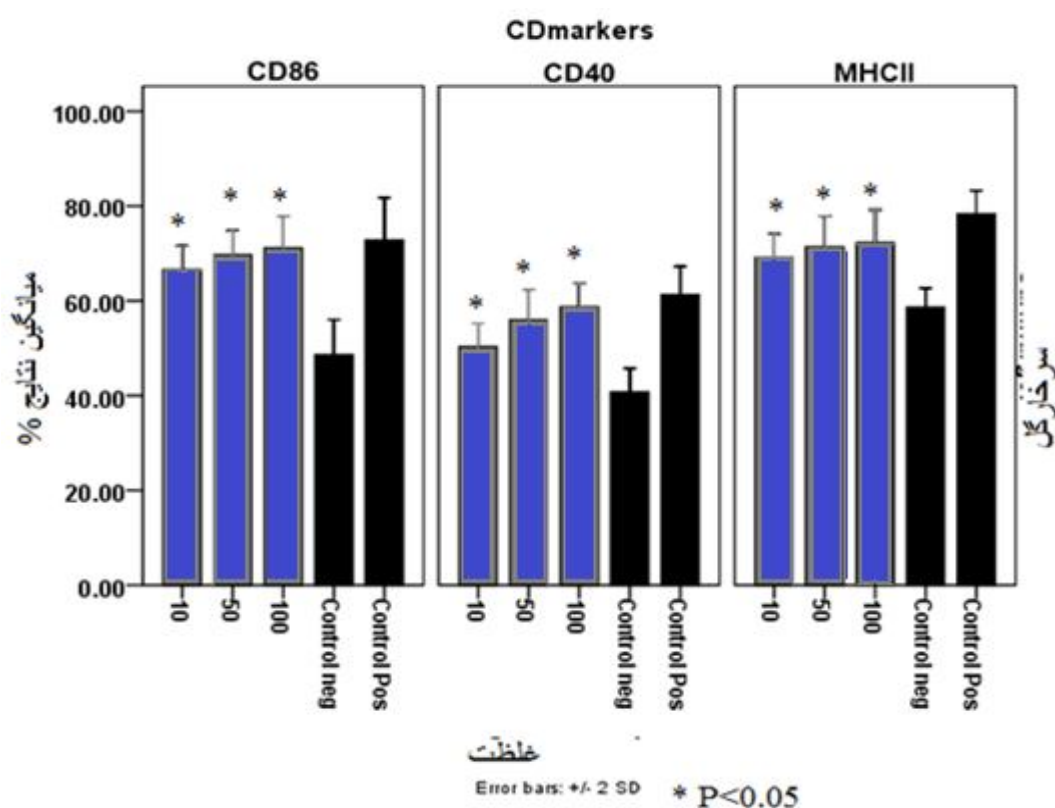


* $P < 0.05$

تصویر شماره (۱۱): نتایج تاثیر غلظتهای مختلف اسانس رازیانه بر مارکهای سطحی بلوغ سلولهای عرضه کننده

حرفه ای آنتی ژن

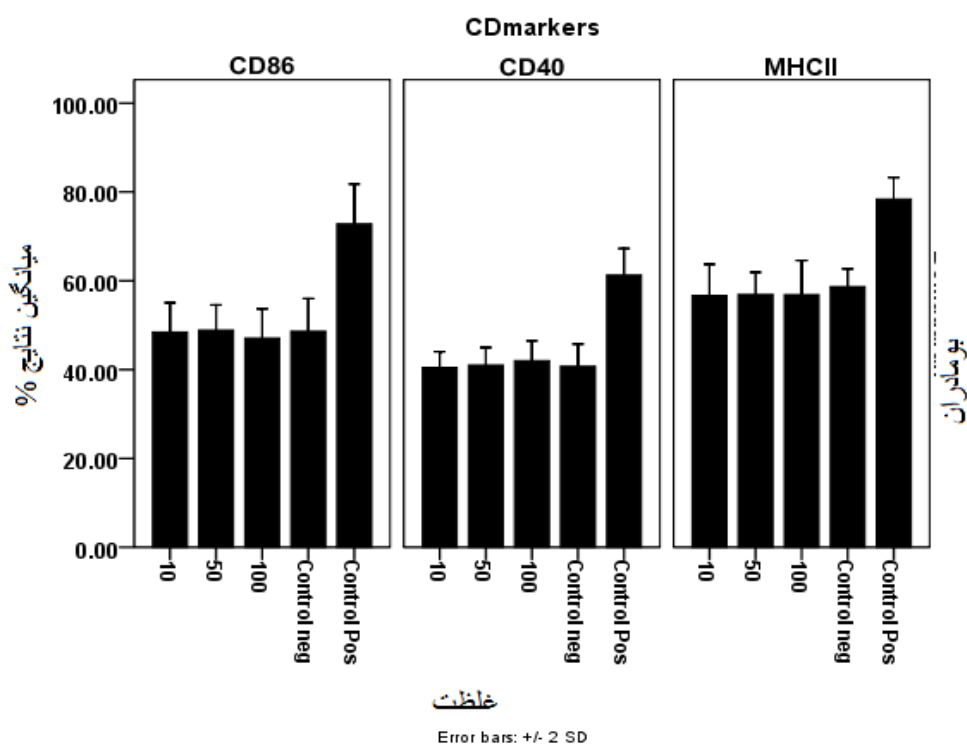
عصاره گیاه سرخارگل به نسبت گروه کنترل منفی افزایش معنی داری بر هر سه مارکر نشان داد که بیشترین میزان آن در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ دیده شد ($P < 0.05$). از نتایج این طور برداشت می شود که این گیاه با خواص ایمنومدولاتوری باعث افزایش هر سه مارکر مورد بررسی گردید. همچنین گروه کنترل مثبت به نسبت گروه کنترل منفی که فقط با محیط کشت به تنهایی در تماس بودند باعث افزایش هر سه مارکر CD86، CD40، و MHCII شد ($P < 0.05$).



تصویر شماره (۱۲): نتایج تاثیر غلظتهای مختلف عصاره سرخارگل بر مارکهای سطحی بلوغ سلولهای عرضه کننده

حرفه ای آنتی ژن

اسانس بومادران در غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ $\mu\text{g/ml}$ بر مارکر CD86 اثر افزایشی و در غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ روی این مارکر اثر کاهشی داشت. همچنین غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ اسانس مذکور روی مارکر MHCII اثر کاهشی نشان دادند. غلظت ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ باعث کاهش CD40 و غلظت‌های بالاتر باعث افزایش آن شدند، اما این اثر در هیچ یک از غلظت‌ها معنی دار نبود ($P>0.05$). آنالیزهای آماری نشان داد که گروه کنترل مثبت در مقایسه با گروه کنترل سبب افزایش مارکرهای CD86، CD40 و MHCII در سطح سلول‌های عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن شد ($P<0.05$).



تصویر شماره (۱۳): نتایج تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس بومادران بر مارکرهای سطحی بلوغ سلول‌های عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن

فصل ششم

بحث

در این مطالعه اثرات اسانس و عصاره اتانولی ۷ گیاه سرخارگل، افسنطین، بومادران، رازیانه، گردو، آزاد درخت، اکالیپتوس در شرایط آزمایشگاهی و در دمای 37°C سانتی گراد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک در غلظتهای $3, 5, 10, 25, 50$ و 100 mg/ml و در مدت زمانهای مواجهه ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه آزمایش شد. همچنین اثر ایمنومدولاتوری گیاهان موثر بر پروتواسکولکس ها بر روی بلوغ سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه ما عصاره آزاد درخت در تمام غلظتهای مورد استفاده و مدت زمانهای مواجهه بر روی پروتواسکولکس ها اثر چشمگیری نداشت.

در مطالعه مروری Hammond و همکاران که اثر میوه پودر شده و عصاره اتانولی آزاددرخت در جوجه های آلوده به انگل *Ascaridia galli* مورد بررسی قرار گرفت، به ترتیب باعث کاهش تخم های دفع شده در جوجه های مذکور به میزان ۵۸٪ و ۶۸٪ شدند که حاکی از تاثیر بهتر عصاره نسبت به پودر میوه گیاه مذکور بود و این تاثیر چشمگیر بود. همچنین در بررسی دیگر محققین مذکور، تاثیر پودر گیاه بر روی نماتودهای بز پس از گذشت مدت زمانهای ۳، ۱۰ و ۱۵ روز به

ترتیب دفع تخم را ۷۹٪، ۹۶٪ و ۱۰۰٪ کاهش داد و با افزایش مدت زمانهای مواجهه این تاثیر بیشتر بود (۴۴). ولی در مطالعه ما تاثیر عصاره گیاه مذکور حتی در غلظتهای بالا قابل توجه نبود.

در مطالعه Cala و همکاران، اثر ضد کرمی عصاره هگزانی جهت جلوگیری از باز شدن تخم ها و پوست اندازی لارو دو انگل گوسفندی (همونکوس کونتوتوس و تریکوسترنزیلوس) بررسی شد. عصاره گیاه مذکور در غلظتهای $572/2 \mu\text{g/ml}$ و $1137/8$ بعد از ۲۴ ساعت مواجهه با تخم انگل ها، به ترتیب از باز شدن ۵۰ و ۹۹ درصد تخم ها جلوگیری کرد. همچنین با غلظتهای $0/7 \mu\text{g/ml}$ و $60/8 \mu\text{g/ml}$ پس از ۴ روز مجاورت، از پوست اندازی ۵۰ و ۹۹ درصد لاروها جلوگیری کرد. بررسی محققین نشان داد که آزاد درخت دارای اثر ضد انگلی ضعیفی می باشد (۴۵). در مطالعه ما نیز عصاره آزاددرخت در همه غلظتها و مدت زمان های مواجهه اثر قابل توجهی روی پروتواسکولکس ها نداشت به طوری که در بیشترین غلظت (100mg/ml) و مدت مواجهه (۶۰ دقیقه) فقط باعث مرگ $28/94$ درصد از پروتواسکولکس ها شد.

مطالعه Szewczuk و همکاران بر روی اثر عصاره آزاد درخت و پپرازین با غلظتهای $0/1$ ، $0/2$ و $0/4$ درصد بر روی دو انگل *Taenia solium* و *Pheretima posthuma* نشان داد که زمان مرگ کرمها برای غلظت $0/1$ ٪ و $0/2$ ٪ پپرازین فسفات به ترتیب ۸۰ دقیقه و ۵۶ دقیقه و برای عصاره میوه آزاددرخت به ترتیب ۵۲ و ۳۲ دقیقه بود. این بررسی مشخص کرد که میوه آزاددرخت اثر ضد انگلی بهتری به نسبت پپرازین فسفات بر روی هر دو انگل دارد (۴۶). در مطالعه ما بر خلاف مطالعه فوق عصاره آزاد درخت فعالیت ضد انگلی مناسبی بر علیه پروتواسکولکسهای نشان نداد که شاید این مسئله مربوط به گونه انگل ها باشد.

Wandscheer و همکاران اثر ضد لاروی عصاره های اتانولی میوه آزاد درخت و گیاه *Azadirachta indica* را در غلظتهای ۰/۰۰۳۳ تا ۰/۰۵ گرم درصد و در محیط آبی و شرایط مساوی روی پشه *Aedes aegypti* بررسی کردند. نتایج نشان داد که آزاد درخت در مقایسه با گیاه مورد آزمایش دیگر که در این مطالعه استفاده شده بود اثر ضد لاروی کمتری داشت (۴۷). نتایج مطالعه ما نیز نشان داد که در شرایط یکسان، آزاد درخت در مقایسه با سایر گیاهان نتایج قابل ملاحظه ای روی پروتواسکولکس ها نشان نداد.

Maciel و همکاران بر روی فعالیت تخم کشی و لارو کشی عصاره هگزانی و اتانولی میوه و عصاره کلروفورمی و اتانولی برگهای آزاددرخت بر روی انگل *Haemonchus contortus* مطالعه ای انجام دادند. بهترین اثر ممانعت از باز شدن تخم ها و رشد لاروها مربوط به غلظتهای بالاتر (۲۵ و ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) عصاره اتانولی میوه و برگ آزاددرخت بود (۴۸). در مطالعه ما بر خلاف مطالعه فوق اثر چندانی روی پروتواسکولکس ها مشاهده نشد که ممکن است مربوط به گونه انگل و نوع عصاره گیاه باشد.

عصاره برگ گردو نیز در غلظتهای مورد استفاده و مدت زمانهای مواجهه اثر چندانی روی پروتواسکولکس ها نداشت. در غلظت ۱۰۰ mg/ml پس از ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه مواجهه به ترتیب ۹۰/۵۲، ۹۳/۳۰، ۹۹/۵۱ و ۱۰۰٪ پروتواسکولکسها را از بین برد.

بهمنی و همکاران که اثر عصاره متانولی گردو را روی زالو مورد آزمایش قرار دادند و تاثیر آن را با دارو ها مقایسه کردند، متوجه شدند که عصاره مذکور در مقایسه با دارو ها تاثیر ضد کرمی روی زالو

نداشت (۵۱). چنانچه ملاحظه می شود در این تحقیق نیز همچون بررسی ما عصاره گیاه گردو اثر چندانی روی انگل مورد بررسی نشان نداد.

خلیلی دهکردی و همکاران اثر گردو را بر روی انگل تریکوموناس واژینالیس بررسی کردند. در این مطالعه مشخص شد که غلظتهای بالاتر عصاره مذکور (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ mg/ml) باعث کاهش معنی دار تعداد انگل نسبت به محیط شاهد شدند ($P < 0/05$) (۵۳). نتایج این تحقیق با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه ما نیز غلظت ۱۰۰ mg/ml از دقیقه ۳۰ مواجهه به بعد، به ترتیب باعث مرگ ۹۰/۵۲، ۹۳/۳۰، ۹۹/۵۱ و ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها شد.

عصاره افسنطین در همه غلظتهای و مدت زمانهای مواجهه به جز ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ تاثیر چندانی بر روی پروتواسکولکس ها نداشت. در غلظت ۵۰ mg/ml در دقایق ۵۰ و ۶۰ مواجهه به ترتیب باعث کشته شدن ۴۸/۵۱ و ۵۲/۵۳ درصد از پروتواسکولکس ها شد. در غلظت ۱۰۰ mg/ml از دقایق ۱۰ تا ۶۰ مواجهه باعث مرگ ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها شد. همچنین در بررسی ایمنومدولاتوری عصاره گیاه مذکور بر مارکرهای بلوغ سلولهای عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای (CD86، CD40 و MHCII) مشخص شد که عصاره اتانولی افسنطین در غلظت ۱۰۰ µg/ml مارکر CD40 را به طور معنی داری افزایش داد و این افزایش در غلظتهای دیگر و سایر مارکرها معنی دار نبود.

Hammond و همکاران در یک مطالعه مروری نشان دادند که ماده chuanliansu در درمنه کوهی (*Artemisia*) دارای اثر ضد کرمی است (۴۴). چنانکه در مطالعه ما نیز افسنطین اثر ضد پروتواسکولکسی ۱۰۰٪ در بیشترین غلظت مورد مطالعه (۱۰۰ mg/ml) نشان داد که دلیل آن می تواند وجود این ترکیب در عصاره مورد استفاده ما باشد.

رستمی و همکاران (سال ۱۳۹۰) تاثیر عصاره درمنه کوهی (افسنطین) بر موش های BALB/c آلوده شده با لیشمانیا ماژور را مورد بررسی قرار دادند. مشاهده کردند که از بین غلظتهای مورد آزمایش گیاه مذکور (۰/۰۹mg/kg، ۰/۳۶، ۱/۴۴، ۶) فقط غلظتهای بالا (۱/۴۴ mg/kg و ۶) باعث ایجاد کاهش معنی داری در اندازه زخم ها و کاهش بزرگی کبد و طحال، غدد لنفاوی و کاهش بار انگلی داخل ماکروفاژ شدند (۵۶). در مطالعه مذکور نیز همسو با مطالعه ما در غلظتهای پایین اثر قابل توجهی روی زخمها و آزدردگی های بافتی نداشت. در تحقیق ما اثر عصاره گیاه درمنه کوهی در غلظتهای ۳-۵۰ mg/ml تاثیر قابل توجهی بر انگل نداشت و فقط در غلظتهای بالا باعث مرگ ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها شد.

Sen و همکارانش به منظور بررسی عملکرد آرتیمیسینین (از ترکیبات گیاه درمنه کوهی) بر توقف چرخه زندگی انگل لیشمانیا دونووانی تحقیقی انجام دادند و مشخص شد پس از ۲۴ ساعت کشت با عصاره، غلظت های ۱۶۰ μM و ۲۲ μM آرتیمیسینین به ترتیب باعث کشتن ۵۰٪ پروماستیگوت و آماستیگوت ها می شود. نتیجه این تحقیق نشان داد که ترکیب آرتیمیسینین اثر ضد لیشمانیایی خوبی دارد (۵۷). در مطالعه ما نیز نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره گیاه افسنطین در غلظتهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml اثر ضد پروتواسکولکسی خوبی است. این تاثیر احتمالاً می تواند به دلیل وجود ترکیب آرتیمیسین در عصاره گیاه مذکور باشد

در مطالعه Caner و همکاران که اثر عصاره متانولی *Artemisia vulgaris* و *Artemisia absinthium* روی تریشینلا اسپیرالیس مورد بررسی قرار گرفت، از بین غلظتهای ۳۰۰mg/kg و ۶۰۰ عصاره های مذکور، غلظت بیشتر (۶۰۰mg/kg) به میزان بیشتری از ایجاد لارو

در عضلات جلوگیری کرد (۵۸). در مطالعه ما نیز همجهت با این مطالعه، غلظت‌های بالاتر اثر ضد پروتواسکولکسی بیشتری داشتند به طوریکه در غلظت ۵۰ mg/ml در مدت زمانهای ۱۰ تا ۶۰ دقیقه به ترتیب ۲۰/۹۲، ۲۶/۴۵، ۳۰/۹۴، ۳۹/۰۹، ۴۸/۵۱ و ۵۲/۵۶ درصد پروتواسکولکس ها و در بیشترین غلظت (۱۰۰mg/ml) تمام پروتواسکولکسها کشته شدند.

Edris در یک مقاله مروری عنوان کرد که اسانس یکی از گونه های درمنه (*Artemisia arborescens*) دارای فعالیت ضد ویروسی بر علیه ویروس تبخال نوع ۱ (HSV- 1) است (۵۹). مطالعه ما نیز نشان داد که عصاره گیاه درمنه کوهی دارای اثر ضد پروتواسکولکسی است و این اثر احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات شیمیایی در اسانس و عصاره گیاه درمنه کوهی است.

Nibret و همکارش اثرعصاره دی کلرومتان چهار گونه درمنه کوهی (افسنطین) را بر تریپانوزوما بروستی بررسی کردند. غلظت‌های مورد استفاده آنها ۲۵۰ mg/ml - ۳/۹۱ و مدت زمان کشت در مجاورت عصاره ۴۸ ساعت بود. غلظت‌های پایین تر از ۵۰µg/ml گونه *Artemisia absintium* توانست ۵۰٪ انگل ها را از بین ببرند. دراین مطالعه به وجود ترکیبات شیمیایی از جمله آرتیمیسینین در عصاره گیاه اشاره شد که می تواند دلیل اثر ضد تریپانوزومی آن باشد (۶۰). گونه *Artemisia absintium* که در مطالعه ما نیز مورد استفاده قرار گرفته و اثر ضد پروتواسکولکسی خوبی در غلظت ۱۰۰ mg/ml نشان داد که احتمالاً به دلیل ترکیبات موجود در آن از جمله آرتیمیسینین باشد که در تحقیق فوق نیز به آن اشاره شد.

طی یک مطالعه مروری، Perez و همکاران اثر اسانس گونه ای از درمنه (*Artemisia abrotanum*) را روی تک یاخته های مختلفی از جمله لیشمانیا آمازونن سیس مطالعه کردند و مشاهده شد این اسانس اثر ممانعت از رشد بر پروماستیگوت و آماستیگوت ها را دارد (۶۱). که در مطالعه حاضر نیز افسنطین در بعضی غلظتها اثر با ارزشی در کاهش ویابیلیتی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک نشان داد.

در مطالعه Doroodgar و همکاران که به بررسی اثر اسانس هیدرو الکلی *Artemisia sieberi* در موش های BALB/c مبتلا به لیشمانیوز جلدی پرداخته شد. از بین ۳ غلظت مورد استفاده در این مطالعه (۱٪، ۳٪ و ۵٪) غلظتهای بالاتر (۳٪ و ۵٪) توانستند کاهش معنی داری در قطر زخمهای ایجاد شده به وجود آورند (۶۲). در مطالعه ما نیز غلظتهای بالاتر عصاره اتانولی درمنه (۱۰۰ و ۵۰ mg/ml) توانست اثر کشندگی ۱۰۰٪ روی پروتواسکولکسها داشته باشد و افزایش غلظت، باعث افزایش میزان اثر گذاری عصاره مورد آزمایش شد.

خلیلی دهکردی و همکاران اثر افسنطین را بر انگل تریکوموناس واژینالیس بررسی کردند و مشخص شد که تمام غلظتهای مورد استفاده عصاره مذکور به جز غلظت ۳/۱۲ mg/ml باعث کاهش معنی دار در تعداد انگل نسبت به محیط شاهد شدند ($P < 0/05$) (۵۳). در مطالعه ما نیز غلظت های کمتر عصاره افسنطین نتوانستند کاهش قابل توجهی در مرگ پروتواسکولکسها ایجاد کنند به طوری که در غلظت ۳ mg/ml در بیشترین زمان مواجهه (۶۰ دقیقه) فقط ۱۰/۷۸٪ پروتواسکولکس ها از بین رفتند.

مطالعه Bao و همکاران روی پلی ساکارید FAAP-02 جدا شده از *Artemisiae argyi* نشان داد که این پلی ساکارید می تواند از رشد سلول های توموری سارکوما در موش جلوگیری کند. این اثر با افزایش دوز پلی ساکارید افزایش میابد. همچنین این پلی ساکارید می تواند میزان IL2، IL6، IL12 و $TNF-\alpha$ در سرم موش را افزایش دهد و باعث افزایش تکثیر لنفوسیت های T دارای مارکرهای $CD4+$ ، $CD8+$ در طحال شوند (۷۸). مطالعه ما نشان داد که عصاره گیاه افسنتین دارای اثر ایمنو مدولاتوری روی سلول های دندریتیک است. گونه گیاه مورد آزمایش در این مطالعه با گونه مورد استفاده ما متفاوت بود. برای بررسی بیشتر ترکیبات شیمیایی مشترک گیاهان این خانواده و اثر عصاره ها بر سایتوکاین ها و مارکرهای مختلف نیاز به انجام مطالعات دیگری می باشد.

در مطالعه Attard و همکار روی ۱۰ گونه گیاه خانواده کاسنی مشخص شد که ۶ گونه از گیاهان بررسی شده در این خانواده دارای خواص ایمنومدولاتوری هستند و محققان احتمال دادند که این تاثیر به خاطر وجود فلاونوئیدها در عصاره گیاهان است (۷۹). با توجه به اینکه گیاه افسنتین نیز در خانواده کاسنی قرار دارد احتمال دارد خاصیت ایمنومدولاتوری این گیاه به دلیل وجود بعضی ترکیبات شیمیایی مثل فلاونوئیدها در عصاره آن باشد.

مطالعه Kim و همکاران با بررسی عصاره متانولی *Artemisia capillaris* روی سلول های سرطانی رده Hepa-1c1c7 و Hepa-1c1c7 در موش نشان داد که این سلول ها باعث کاهش معنی دار مارکرهای $CD3+$ ، $CD4+$ ، $CD8+$ و $TNF-\alpha$ سلول های طحال و سرکوب سلول های سرطانی می شود (۸۰). در مطالعه حاضرتیجه بررسی عصاره اتانولی افسنتین

Artemisia absinthium باعث افزایش سه مارکر MHCII، CD86 و CD40 شد که در افزایش مارکر CD40 اثرات معنی داری نشان داد. برای بررسی اثرات دیگر این گیاه روی سایر سلول ها و سایتوکاینهای سیستم ایمنی باید مطالعات دیگری صورت گیرد.

اسانس رازیانه در غلظتهای ۳mg/ml و ۵ اثر قابل توجهی بر روی پروتواسکولکس ها نداشت. ولی در غلظت ۱۰ mg/ml پس از ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه مواجهه به ترتیب ۶۵/۹۳، ۵۶/۰۴، ۴۶/۲۵ درصد و با غلظت ۲۵ mg/ml بعد از ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب ۹۸/۲۳، ۹۹/۶۴، ۹۹/۷۱، ۹۹/۷۸ و ۹۹/۸۳٪ از پروتواسکولکس ها را از بین برد. در غلظتهای ۵۰mg/ml و ۱۰۰ اثر گیاه مذکور ۱۰۰٪ بود. همچنین اسانس اتانولی رازیانه در غلظت ۱۰ µg/ml و ۵۰ بر روی هر سه مارکر اثر کاهشی داشت. اما در غلظت ۱۰۰ µg/ml اثر افزایشی روی مارکهای مورد بررسی نشان داد که این اثر در غلظت ۱۰۰µg/ml برای مارکر CD40 معنا دار بود ($P<0.05$). گروه کنترل مثبت سبب افزایش معنا دار تمامی مارکهای سلول های عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن در مقایسه با کنترل منفی شدند.

در تحقیق Conti و همکاران اثر حشره کشی اسانس روغنی چند گیاه از جمله رازیانه روی لارو پشه آئدس آلبوپیکتوس بررسی شد و مشاهده گردید که اثر کشندگی این گیاه با غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ به میزان ۵، ۳۳/۳، ۴۸/۳، ۹۶/۷، ۹۸/۳ و ۱۰۰ درصد بود و در غلظت های بین ۲۰۰ppm تا ۳۰۰ باعث از بین رفتن ۹۸/۴۳٪ از لاروها گردید. در طی این آزمایش آنها دریافتند که شدت مرگ و میر لاروها کاملاً وابسته به غلظت اسانس بود (۶۳). در تحقیق ما نیز همسو با مطالعه ذکر شده با افزایش غلظت اسانس میزان کشندگی آن بالا رفت.

در تحقیق نائینی و همکاران که اثرات ضد کاندیدایی اسانس و عصاره ۵۰ گیاه دارویی روی سویه ی استاندارد کاندیدا آلبیکنس بررسی شد مشاهده گردید که از ۵۰ گیاه مورد مطالعه ۱۶ گیاه دارای فعالیت ضد کاندیدایی بود. در این مطالعه قطر هاله عدم رشد داروهای ضد قارچ مورد استفاده از جمله آمفوتریسین B، کتوکونازول و نیستاتین به ترتیب ۱۶، ۲۳ و ۲۵ و اثر اسانس گیاه رازیانه مانند نیستاتین گزارش شد و این اثر را متوسط ارزیابی کردند (۶۴). در مطالعه حاضر نیز اسانس گیاه رازیانه روی پروتواسکولکس ها در غلظتهای پایین قابل ملاحظه نبود ولی در غلظتهای بالا قابل توجه بود چنانچه در غلظتهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml، این اثر ۱۰۰٪ بود.

در مطالعه رنجبریان و همکاران اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهی رازیانه بر روی ۱۴ سویه هلیکوباکتر پیلوری بررسی شد. از ۱۴ سویه هلیکوباکتر پیلوری ۹ سویه به عصاره رازیانه حساس بودند (۶۵). طبق مطالعه ذکر شده اسانس رازیانه می تواند روی میکروارگانیسم های مختلف اثر متفاوتی داشته باشد در مطالعه ما نیز این گیاه اثر خوبی در غلظتهای بالا روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک نشان داد ولی در غلظتهای پایین این اثر مناسب نبود که این تفاوت اثر می تواند مربوط به جنس و گونه انگل باشد.

Sharififar و همکاران با بررسی خواص ایمنومدولاتوری عصاره آبی گیاه گلپر از خانواده چتریان در موش نشان دادند که غلظتهای ۵۰ mg/kg، ۱۰۰ و ۲۰۰ این گیاه باعث افزایش وزن ارگانهای کبد، کلیه و طحال و نیز افزایش واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری و افزایش تیترا همآگلوتیناسیون می شود که این افزایش در غلظت ۱۰۰ mg/kg معنی دار بود. این غلظت بهترین میزان ایمنی همورال را نیز نشان داد (۸۱). مطالعه ما نیز نشان داد که گیاه رازیانه که از خانواده

چتریان است دارای اثرات ایمنومدولاتوری است و در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ میزان مارکر MHCII را به طور معنی داری افزایش داد. احتمالاً این تاثیر به دلیل وجود ترکیباتی مثل فلاونوئید ها و فورانوکومارین ها در این خانواده است. بررسی بیشتر جهت اثرات ایمنومدولاتوری این گیاه بر ژنوم مارکرهای فوق و همین طور سایتوکاینهای موثر در بالانس پاسخ های Th1 و Th2 ضروری هستند.

مطالعه Karimi و همکاران نشان داد که اسانس جعفری از خانواده چتریان باعث مهار تکثیر لنفوسیت ها و کاهش تولید نیتریک اکساید در غلظتهای $10 \mu\text{g/ml}$ و 100 از ماکروفاژ می شود (۸۲). اسانس رازیانه نیز که با گیاه مورد بررسی در این تحقیق در یک خانواده قرار دارد و دارای اثرات ایمنومدولاتوری بود. برای بررسی سایر اثرات این گیاه و فرکشنهای مختلف این عصاره روی سلول های ایمنی نیاز به انجام مطالعات تکمیلی می باشد.

اسانس گیاه بومادران در غلظت 3 mg/ml از ۳۰ تا ۶۰ مواجهه به ترتیب روی ۶۹/۹۴، ۷۱/۹۱، ۷۲/۰۵ و ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس ها و در غلظت 5 mg/ml در ۲۰ و ۳۰ به ترتیب روی ۵۳/۲۹، ۷۲/۵۵ و از ۴۰ تا ۶۰ روی ۱۰۰ درصد پروتواسکولکسها و در غلظت 10 mg/ml در ۱۰، ۲۰ و ۳۰ به ترتیب روی ۶۸/۶۲، ۸۸/۴۲، ۹۶/۲۱ درصد و از ۴۰ تا ۶۰ روی ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس ها تاثیر داشت. در غلظتهای 25 mg/ml ، ۵۰ و ۱۰۰ در تمام مدت زمانهای مواجهه اثرکشدگی بر روی پروتواسکولکس ها ۱۰۰٪ بود. همچنین اسانس بومادران در غلظتهای $10 \mu\text{g/ml}$ و ۵۰ بر روی مارکر CD86 اثر افزایشی و در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ اثر کاهشی داشت. همچنین غلظتهای $10 \mu\text{g/ml}$ ، ۵۰ و ۱۰۰ روی مارکر MHCII اثر کاهشی نشان دادند. غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ باعث کاهش CD40 و غلظتهای بالاتر باعث افزایش آن شدند، اما این اثر در

هیچ یک از غلظت‌ها معنی دار نبود ($P > 0.05$). آنالیزهای آماری نشان داد که گروه کنترل مثبت در مقایسه با گروه کنترل سبب افزایش مارکرهای CD86، CD40 و MHCII در سطح سلول‌های عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن شد ($P < 0.05$).

در تحقیق خلیلی دهکردی و همکاران، اثر غلظتهای ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ چند عصاره گیاهی از جمله بومادران در مدت زمان های مواجهه ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر تریکوموناس واژینالیس بررسی شد و مشاهده گردید تمام غلظتهای این عصاره باعث کاهش تعداد تریکوموناس واژینالیس شده است و به جز در غلظتهای پایین تر (۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵) ، در باقی غلظتها این کاهش معنا دار بود. این روند با افزایش غلظت عصاره و مدت زمان مواجهه افزایش یافت (۵۳). که با تحقیق حاضر مطابقت داشته و در مطالعه ما نیز، در غلظتهای ۲۵mg/ml و ۵۰ و ۱۰۰ و در تمام مدت زمانهای مواجهه اثر ضد پروتواسکولکسی گیاه ۱۰۰٪ بود.

مطالعه حجازی و همکاران برای مقایسه اثر بخشی عصاره هیدروالکلی چند گیاه از جمله بومادران بر ضایعات جلدی لیشمانیا مازور در موش های BALB/c، نشان داد که قطر زخم موش ها پس از استفاده ۳ هفته ای عصاره بومادران از $4/35 \pm 0/5$ به $3/4 \pm 0/67$ میلی متر کاهش یافت. این کاهش معنی دار بود و عصاره بومادران اثر ضد لیشمانیایی مناسبی داشت (۶۶). که با مطالعه ما همسو بوده و اسانس بومادران اثر خوبی روی پروتواسکولکس ها داشت به طوریکه در غلظتهای ۲۵mg/ml، ۵۰ و ۱۰۰ در تمام دقایق مواجهه باعث مرگ ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها شد.

تحقیق ایزدی و همکاران روی اثر عصاره آبی بومادران در غلظتهای ۱/۳، ۲/۶، ۴، ۵/۶، ۶/۶، ۸، ۹/۳، ۱۰/۶، ۱۲، ۱۳/۳ و ۲۰ و اسانس بومادران در غلظت ۰/۰۵ و ۰/۰۶ بر عفونت

اکسیور در موشهای BALB/c، نشان داد که غلظت ۲۰mg/dl عصاره بومادران در زمانهای ۱، ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت و در شرایط *in vitro* لارو اکسیور را از بین برد ولی تاثیری در تبدیل تخم انگل به لارو نداشت. نتایج آزمایش در موش ها، اثر قطعی این عصاره ها در کاهش دفع کرم را نشان داد. افزایش غلظت عصاره و اسانس ها میزان تاثیر آنها بر کشندگی انگل را نیز افزایش داد و احتمال دادند که وجود ترکیب کومارین در اسانس و عصاره این گیاه مسئول اثر مذکور باشد (۶۷). در مطالعه حاضر نیز اسانس بومادران تاثیر چشمگیری روی پروتواسکولکسها داشت و همین طور افزایش غلظت اسانس باعث افزایش اثر کشندگی روی پروتواسکولکسها شد. میزان اثر پروتواسکولیسید در غلظت ۱۰mg/ml در مدت زمانهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه به ترتیب ۶۹/۲۱، ۸۹/۴۲، ۹۶/۲۱ درصد بود ولی این اثر از دقایق ۴۰ تا ۶۰ روی پروتواسکولکس ها ۱۰۰٪ بود.

مطالعه سال ۲۰۱۱ Jonsdottir و همکاران نشان داد که عصاره آبی بومادران با کاهش سایتوکاینهایی مثل IL-17 باعث می شود تا فعالیت سلول های TH17 کاهش یابد (۸۳). مطالعه ما نشان داد که اسانس بومادران اثر کاهشی روی مارکرهای سطحی سلول های دندریتیک دارد. بررسی بیشتر جهت اثرات ایمنومدولاتوری عصاره و اسانس این گیاه بر سایتوکاینهای موثر در بالانس پاسخ های Th1 و Th2 ضروری هستند

اثر اسانس اکالیپتوس بر روی پروتواسکولکس ها در غلظت ۳ و ۵ mg/ml در تمام مدت زمانهای مواجهه به جز ۶۰ دقیقه مواجهه و غلظت ۵ mg/ml غیر قابل ملاحظه بود. در غلظت و مدت زمان مواجهه مذکور این اثر ۵۳/۳۳٪ بود. غلظت های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ در تمام مدت زمانهای مواجهه، باعث از بین رفتن ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها شدند. همچنین آنالیز اثر اسانس اتانولی گیاه

اکالیپتوس به روی سه مارکر مورد بررسی نشان داد که اثر این اسانس در غلظت پایین تر ($10 \mu\text{g/ml}$) بر مارکرهاي CD86، CD40 و MHCII اثر کاهشي داشت. در غلظتهاي $50 \mu\text{g/ml}$ و $100 \mu\text{g/ml}$ بر مارکر MHCII اثر کاهشي و بر CD86 و CD40 اثر افزايشي داشت اما اين اثر معني دار نبود. همين طور آناليز آماري نشان داد که گروه کنترل مثبت مواجه شده با LPS به نسبت کنترل منفي سبب افزايش معني دار تمام مارکرها شدند ($P < 0.05$).

در مطالعه Macedoa و همکاران اثر ضد کرمي اسانس يک گونه اکالیپتوس (*Eucalyptus staigeriana*) روی نماتود روده بز (همونکوس کونتورتوس) بررسی شد. غلظتهاي $1/35 \text{mg/ml}$ از باز شدن $99/27\%$ تخمها و $5/4 \text{mg/ml}$ از پوست اندازی $99/20\%$ لارو ها ممانعت کرد. طبق آناليز اسانس اکالیپتوس ترکيباتي از جمله آلفا پينن، بتا پينن، بتا ميرسن، آلفا فلاندرن، اُسيمن، ليمونن، اوکالپتول، ترپينين، آلفا ترپينولن، بتا لينالول، بتا سيترونالال، ٤-ترپينئول، آلفا ترپينئول، سيس گرانول، زد-سيترال، ترانس گرانول، ای سيترال، متيل گرانت، نرول استات و گرانول استات يافت شد که احتمال داده می شود از دلايل اثر کشندگی اسانس گیاه اکالیپتوس روی انگل ها وجود اين ترکيبات باشد (٦٨). در تحقيق ما نيز اسانس اکالیپتوس تاثير خوبي روی پروتواسکولکس ها داشت به طوریکه از غلظت 10mg/ml در تمام مدت زمانهای مواجهه اثر ضد پروتواسکولکسي 100% بود. طبق مطالعه فوق احتمال دارد اثر مناسب اسانس اين گیاه روی پروتواسکولکس ها به دليل وجود ترکيبات مذکور در اين گیاه باشد.

بهداري و همکارش، اثر چند ترکيب گیاهی از جمله اکالیپتوس بر جرب قرمز در طیور (درمانيسوس گالينه) را بررسی کردند. عصاره اکالیپتوس به ميزان 63mg/cm^3 به قفس های آلوده به

مایت اسپری شد و به یک قفس به عنوان شاهد دارویی اسپری نشد. اثر عصاره مذکور در روزهای اول و هفتم پس از انجام اسپری به ترتیب ۸۵/۸۰٪ و ۱۴/۵۸٪ بود که به نسبت گروه شاهد و عصاره های دیگر گیاهی، اثری معنی دار و طولانی مدت داشت (۶۹). در تحقیق حاضر نیز همچون مطالعه فوق اکالیپتوس اثر خوبی در کشتن پروتواسکولکس ها نشان داد.

Yoshimura و همکاران روی ترکیب Oenothrin B، یک تانن در گیاهان خانواده مورد که اکالیپتوس نیز از اعضای آن است مطالعه ای انجام دادند. نتایج بررسی آنها نشان داد که این ترکیب در غلظت ۱۰۰ μM باعث کاهش CD83 و CD1a شد و تغییر معنی داری در کاهش یا افزایش CD86 ایجاد نکرد. هم چنین این ترکیب به طور معنی داری سایتوکاینهای سلول را کاهش داد (۸۴). در مطالعه ما اسانس اکالیپتوس در غلظتهای بالا روی CD86 اثر کاهشی داشت که معنا دار نبود. برای تحقیق بیشتر بر روی خواص ایمنومولاتوری هر یک ترکیبات اسانس این گیاه مطالعات دیگر ضروری هستند.

عصاره گیاه سرخارگل در غلظت ۳ mg/ml در تمام مدت زمانهای مواجهه اثر پروتواسکولیسیدال قابل ملاحظه ای نداشت اما در غلظت ۵mg/ml، در زمانهای مواجهه ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه، به ترتیب روی ۶۹/۰۵، ۷۵/۸۸، ۸۵/۶۷ درصد و در مدت زمانهای مواجهه ۴۰ تا ۶۰ دقیقه روی ۱۰۰٪ پروتواسکولکسها اثر کشندگی داشت. همچنین عصاره گیاه سرخارگل به نسبت گروه کنترل منفی افزایش معنی داری بر هر سه مارکر نشان داد که بیشترین میزان آن در غلظت ۱۰۰ μg/ml دیده شد ($P < 0.05$). از نتایج این طور برداشت می شود که این گیاه با خواص ایمنومولاتوری باعث افزایش هر سه مارکر مورد بررسی گردید. همچنین گروه کنترل مثبت به نسبت گروه کنترل منفی که فقط با

محیط کشت به تنهایی در تماس بودند باعث افزایش هر سه مارکر CD86، CD40 و MHCII شد ($P < 0.05$).

Spoolder و همکاران در سال ۲۰۰۷، پیشگیری و درمان عفونتهای انگلی با *Ascaris suum*، *Trichuris suis* و *Oesophagostomum dentatum* درخوک را با استفاده از عصاره های چند گیاه از جمله سرخارگل مورد بررسی قرار دادند. مخلوط این گیاهان، به میزان ۵٪ از کل رژیم غذایی هر روزه، باعث ممانعت از عفونت متوسط با کرمهای گرد شد در حالی که همین گیاهان زمانی که ۳٪ رژیم غذایی را تشکیل می دادند تاثیری در درمان عفونت با میزان مشابه نداشت (۷۴). در این تحقیق نیز، هر چه غلظت عصاره گیاه افزایش یافت، اثر کشندگی آن بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک افزایش پیدا کرد.

اثر سینامالدئید و عصاره سرخارگل بر ضد تک یاخته *Eimeria acervulina* در جوجه ها توسط Orengo و همکاران در سال ۲۰۱۲ بررسی شد. میزان عصاره های تجویز شده ۱۵۰ mg/kg سینامالدئید، ۱۵۰ mg/kg عصاره سرخارگل، ۱۰۰۰ mg/kg مخلوط عصاره سرخارگل و سینامالدئید (به ازای هر کیلو وزن جوجه) بود. کاهش معنی دار آسیب های دئودنال، فقط در جوجه های درمان شده با سینامالدئید دیده شد و در بقیه گروهها کاهش معنی داری در این آسیب ها مشاهده نشد (۷۵). نتایج این مطالعه نشان می دهد که دلیل عملکرد ضد انگلی سرخارگل احتمالاً به دلیل وجود سینامالدئید در این گیاه باشد.

در سال ۲۰۰۷ توسط Soudi و همکاران، اثر ضد انگلی عصاره ریشه گیاه سرخارگل روی لیشمانیا در محیط کشت بررسی شد. غلظت های ۵۰ و ۱۲۵ mg/ml این عصاره، ۱۰۰٪ پروماستیگوتها را در

طول ۴۸ ساعت از بین بردند. نتایج این بررسی مشخص کرد که عصاره اتانولی ریشه این گیاه باعث ممانعت از رشد پروماستیگوتها می شود (۷۶). این مطالعه همسو با مطالعه ما نشان داد که افزایش غلظت و مدت زمان مواجهه باعث افزایش اثر گذاری عصاره گیاهی می شود. در مطالعه ما نیز در غلظتهای ۱۰mg/ml تا ۱۰۰ در تمام مدت زمانهای مواجهه اثر کشندگی ۱۰۰٪ بود. ولی این اثر در غلظتهای ۳ mg/ml و ۵ و در مدت زمانهای مواجهه پایین دیده نشد.

در بررسی دیگری که در غالب یک پایان نامه دانشجویی انجام شد، خواص آنتی اکسیدان و ضد میکروبی عصاره سرخارگل در غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵، و ۰/۷۵٪ بر علیه باکتری های باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلی، انتروباکتریاسیه و استافیلوکوکوس اورئوس در خمیر شیرینی کلمپه بررسی گردید. در نمونه های دارای ۰/۲۵٪ عصاره، تفاوت خاصی از نظر میزان باکتری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. در غلظت ۰/۵٪ تعداد میکروب ها پایین تر از گروه کنترل و در غلظت ۰/۷۵٪ هیچ باکتری، کپک و مخمری مشاهده نشد که نشان می دهد این عصاره می تواند به عنوان ترکیب آنتی اکسیدان و ضد میکروبی عمل کند (۷۷). در تحقیق ما نیز مانند این مطالعه افزایش غلظت عصاره سرخارگل باعث از بین بردن تمام میکرو ارگانیسم ها گردید که در غلظتهای پایین این مسئله محقق نشد.

Benson و همکاران تحقیقی روی اثر عصاره ریشه گیاه سرخارگل در غلظتهای ۴۵۰-۱۵۰ $\mu\text{g/ml}$ و همچنین عصاره برگ گیاه در غلظتهای ۱۵۰-۵۰ $\mu\text{g/ml}$ بر سلول های دندریتیک جدا شده از مغز استخوان موش انجام دادند. عصاره ریشه سرخارگل در تمام غلظتها مارکرهای بلوغ CD11c، MHC II، CD86 و CD54 را افزایش داد. علاوه بر آن عصاره برگ سرخارگل CD11c را

افزایش و CD54, CD86, MHCII را کاهش داد و از بلوغ سلول های دندریتیک جلوگیری کرد. نتیجه مطالعه نشان داد ریشه گیاهان که غنی از پلی ساکارید بود، ترشح IL-6 و TNF- α را افزایش داد. عصاره برگ سرخارگل اثری روی ترشح سایتوکاین ها نداشت. نتایج این بررسی اثر وابسته به دوز عصاره سرخارگل را تأیید کرد (۸۵). در مطالعه ما عصاره سرخارگل باعث افزایش سه مارکر بلوغ مورد بررسی شد. این میزان افزایش در غلظتهای بالاتر بیشتر بود که از این نظر با نتایج حاصل از مطالعه بالا همخوانی دارد. احتمالاً ترکیبات پلی ساکاریدی موجود در عصاره سرخارگل دارای خاصیت ایمنومدولاتوری و افزایش دهنده مارکرهای بلوغ هستند.

در مطالعه Wang و همکاران، اثر تحریک کننده عصاره آبی - الکلی قسمتهای مختلف گیاه سرخارگل (ریشه، ساقه و برگ گیاه، گل و تمام بخشهای گیاه) روی سلول های دندریتیک بررسی شد. غلظتهای ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ به مدت ۲۴ ساعت با سلول های مورد مطالعه کشت داده و بیان مارکرهای CD14، CD32 و HLA-DR روی سلول های مواجه شده با عصاره های مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره گل و ریشه گیاه میزان CD83 را در سلول های دندریتیک به طور معنی داری افزایش می دهند. عصاره ریشه بیان ژن های CCL2، CCL3 و MHCII را افزایش داد که احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات گیاهی ریشه است. غلظتهای ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ عصاره تمام بخش های گیاه، ساقه و برگ و عصاره ریشه و همین طور غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ عصاره گل باعث افزایش HLA-DR شد. در پایان مشخص شد که عصاره گیاه سرخارگل توانایی القای تمایز و بیان ژنهای مرتبط با این سلول ها را دارد (۸۶). نتایج مطالعه ما نیز خواص ایمنومدولاتوری سرخارگل را تأیید می کند.

Burger و همکاران، در بررسی عصاره تازه تهیه شده و عصاره گیاه خشک شده سرخارگل در غلظتهای $0/012 \mu\text{g/ml}$ - 10 روی ماکروفاژها، سایتوکاین های $\text{TNF-}\alpha$ ، IL-6، IL-10 و IL-1 تولید شده از ماکروفاژهای مواجه شده با عصاره را بررسی کردند. ماکروفاژ های کشت داده شده با غلظت $0/012 \mu\text{g/ml}$ سایتوکاین بیشتری نسبت به ماکروفاژهای مواجه نشده با عصاره تولید کردند و با افزایش دوز عصاره تولید این سایتوکاین ها کاهش یافت. این نتایج نشان داد که عصاره خالص نشده سرخارگل دارای اثر محرک بر پاسخ ایمنی است (۸۷). مطالعه ما نیز نشان داد که عصاره سرخارگل باعث افزایش مارکرهای بلوغ روی سلول های دندریتیک در تمام غلظتها می شود. برای بررسی خواص روی سایر سایتوکاین ها، ژنوم سلول و مارکرهای بلوغ و بالانس لنفوسیت های Th1 و Th2 بررسی های دیگر ضروری است.

نتیجه گیری

تمام عصاره ها و اسانس های گیاهان بررسی شده به جز عصاره گیاهان گردو و آزاد درخت دارای اثر پروتواسکولیسیدال خوبی بودند و این اثر در اسانس گیاهان اکالیپتوس، رازیانه، بومادران و عصاره سرخارگل و افسنطین چشمگیر بود. در بررسی ایمنومدولاتوری این گیاهان نیز، اگرچه تمام این گیاهان اثر محرک یا سرکوب گر بر بیان مارکر های CD40، CD86 و MHCII داشتند، سرخارگل در هر سه غلظت 10 ، 50 و $100 \mu\text{g/ml}$ بر روی سه مارکر و رازیانه و افسنطین در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ اثر افزایشی معنا داری روی مارکر CD40 داشتند.

پیشنهادهات:

۱- بررسی اثر اسکولیسیدالی فرکشنهای مختلف گیاهان مورد استفاده و بررسی اثر ایمنومدولاتوری

فرکشن های مذکور به صورت *In vitro*

۲- بررسی اثر ایمنومدولاتوری عصاره ها و اسانسها بر ژنوم بلوغ و عملکردی سلولهای عرضه کننده

حرفه ای آنتی ژن

۳- بررسی اثر ایمنومدولاتوری فرکشنهای این گیاهان بر تولید سایتوکاین ها از سلولهای عرضه کننده

حرفه ای آنتی ژن و بالانس پاسخ های $Th1/Th2$

۴- بررسی اثر گیاهان پروتواسکولیسید بر روی ژنوتایپ های مختلف انگل اکینوкокوس گرانولوزوس

۵- بررسی اثر پروتواسکولیسیدالی و ایمنومدولاتوری گیاهان مورد مطالعه در شرایط *In vivo* و روی

حیوانات آزمایشگاهی

فصل هفتم

فهرست منابع

- 1- McManus D P, Zhang W, Li J, Bartley P B. Echinococcosis. Lancet 2003; 362(9392): 1295–1304.
- 2-Fasihi harandi M , Hobbs R P, Adams P J, Mobedi I, Morgan-Ryan U M, Thompson R C A. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. Parasitology 2002; 125 (04): 367-373.
- 3-Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. Ijid 2009; 13: 125- 133.
- 4-Otero-Abad B, Torgerson PR. A Systematic Review of the Epidemiology of Echinococcosis in Domestic and Wild Animals. plos Negl Trop Dis 2013; 7(6): e2249.
- 5- Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawłowski ZS. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. World Organisation for Animal Health 2001; 20-66.
- 6-Siracusano A, Teggi A, Ortona E. Human Cystic Echinococcosis: Old Problems and New Perspectives. Interdiscip Perspect Infect Dis 2009; Article ID 474368, 7 pages.
- 7- www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Echinococcosis.htm.
- 8- Rokni MB. Echinococcosis /hydatidosis in Iran. Iranian J Parasitol 2009; 1-16.

- 9- Eckert J, Deplazes P. Increasing Concern Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Biological, Epidemiological, and Clinical. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(1): 107–135.
- 10- Geramizadeh B. Unusual Locations of the Hydatid Cyst: A Review from Iran. *IJMS* 2013; 38(1): 2-14.
- 11- Brunetti E, Kern P, Angèle Vuitton D. Writing Panel for the WHO-IWGE. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica* 114 2010; 1–16.
- 12- Teggi A, Lastilla MG , De Rosa F. Therapy of human hydatid disease with mebendazole and albendazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(8): 1679-1684.
- 13- Colino J, Snapper CM. Dendritic cells, new tools for vaccination. Review article. *Microbes Infect* 2003; 5(4): 311–319.
- 14-Hewitson JP, Grainger JR, Maizels Rick M. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 167(1): 1–11.
- 15- Siracusano A, Delunardo F, Teggi A, Ortona E. Host-Parasite Relationship in Cystic Echinococcosis: An Evolving Story. *Clin Dev Immunol* 2012; Article ID 639362: 12 pages.
- 16- Zhang W, Wen H, Li J, Lin R, McManus DP. Immunology and Immunodiagnosis of Cystic Echinococcosis: An Update. *Clinical and Developmental Immunology* 2012; Article ID 101895: 10 pages.
- 17- Collin M, McGovern N , Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology* 2013; 140(1): 22–30.

- 18- Wilson NS, Villadangos JA. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol Cell Biol* 2004; 82: 91–98.
- 19- Rajabi MA. fatal reactions and methaemoglobinaemia after silver nitrate irrigation of hydatid cyste. *Surgical Practice* 2009; 13: 2-7.
- 20-Puryan K, Karadayi L, Topcu O. Chlorhexidine gluconate: an ideal scolicial agent in the treatment of interaperitoeal hydatidosis. *W J Surg* 2005; 29:227-230.
- 21-Moazeni M, Nazer A. In vitro lethal effect of *Zingiber officinale* R. on protoscolices of hydatid cyst from sheep liver. *Microbiol Res* 2011; 2: 91-94.
- 22- Celina Elissondo M, Albani C, Gende L, Eguaras M, Denegri G. Efficacy of thymol against *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasitol Int* 2008; 57(2): 185–190.
- 23- Yones DA, Taher GA, Ibraheim ZZ. In Vitro Effects of Some Herbs Used in Egyptian Traditional Medicine on Viability of Protoscolices of Hydatid Cysts. *Korean J Parasitol* 2011; 49(3):255-263.
- 24-Barzinji, Raoof AK, Mothana, Ahmed R, Abdul Karim N. Effect of leaf extracts of *Dendrosicyos socotrana* and *Jatropha unicostata* on the viability of *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Eurasia J Biosci* 2009; 3: 122-129.
- 25- Maggiore MA, Albanese AA, Gende L, Eguaras MJ, Denegri GM, Celina Elissondo M. Anthelmintic effect of *Mentha* spp. essential oils on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. *Parasitol Res* 2012; 110(3): 1103-1112.

- 26- Sadjjadi SM, Zoharizadeh MR, Panjeshahin MR. In vitro screening of different *Allium sativum* extracts on hydatid cysts protoscoleces. *J Invest Surg* 2008; 21(6): 318-322.
- 27-Moazeni M, Nazer A. In vitro effectiveness of garlic (*Allium sativum*) extract on scolices of hydatid cyst. *World J Surg* 2010; 34(11): 2677-2681.
- 28-Eskandarian AA. Scolicidal effects of squash (*Corylus spp*) seeds, hazel (*Curcubia spp*) nut and garlic (*Allium sativum*) extracts on hydatid cyst protoscolices. *J Res Med Sci* 2012; 17(11): 1011–1014.
- 29- Moazeni M, Roozitalab A. High scolicidal effect of *Zataria multiflora* on protoscoleces of hydatid cyst: an in vitro study. *Comp Clin Pathol* 2012; 21 (1): 99-104.
- 30-Moazeni M, Mohseni M. Sumac (*Rhus coriaria L.*): Scolicidal Activity on Hydatid Cyst Protoscolices. *Surgical Science* 2012; 3(9): 452-456.
- 31- Moazeni M, Saharkhiz J, Hoseini A, Mootabi Alavi A. In vitro scolicidal effect of *Satureja khuzistanica* (Jamzad) essential oil. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(8): 616–620.
- 32- Zibaei M, Sarlak A, Delfan B, Ezatpour B, Azargoon A. Scolicidal effects of *Olea europaea* and *Satureja khuzestanica* extracts on protoscolices of hydatid cysts. *Korean J Parasitol* 2012; 50(1): 53-56.
- 33- Rouhani S, Salehi N, Kamalinejad M, Zayeri F. Efficacy of *Berberis vulgaris* aqueous extract on viability of *Echinococcus granulosus* protoscolices. *J Invest Surg* 2013; 26(6): 347-351.

- 34- Moazeni M, Saharkhiz MJ, Hosseini AA. In vitro lethal effect of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) essential oil on hydatid cyst protoscoleces. *Vet Parasitol* 2012; 187(1-2): 203-208.
- 35- Haghani A, Roozitalab A, Safi SN. Low scolicial effect of *Ocimum bacilicum* and *Allium cepa* on protoscoleces of hydatid cyst: an in vitro study. *Comp Clin Pathol* 2014; 23 (4): 847-853.
- 36- Gholami SH, Rahimi-Esboei B, Ebrahimzadeh MA, Pourhajibagher M. In vitro effect of *Sambucus ebulus* on scolices of Hydatid cysts. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17(13):1760-1765.
- 37- Moazeni M, Nazer A. In vitro lethal effect of *Zingiber officinale* R. on protoscolices of hydatid cyst from sheep liver. *Microbiol Res* 2011; 2: 91-94.

۳۸- دکترعلی زرگری. ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران.

۳۹- ربیع زاده ف، اخوت ا. بالا بردن قطعیت در به کارگیری گیاهان دارویی طب سنتی با مشخص نمودن نام علمی آن ها. مجله طب سنتی اسلام و ایران. سال اول. شماره سوم. پاییز ۱۳۸۹.

۴۰- کیانی ک. ۱۳۸۶. اطلس مصور گیاهان دارویی. انتشارات زرقلم تبریز.

۴۱- ولاگ ژ، استودولا ژ. مترجم زمان س. ۱۳۸۷. گیاهان دارویی. انتشارت ققنوس.

۴۲- رحیمی نیام. ۱۳۹۰. فرهنگ مصور گیاهان دارویی. چاپ سوم. انتشارات اشکذر.

۴۳- ولنه ژان. ترجمه: امامی الف، شمس م، اردکانی، نکوئی ن. ۱۳۸۱. گیاه درمانی: درمان بیماریها توسط گیاهان. انتشارات راه کمال.

44- Hammond JA, Fielding D, Bishop SC. Review Article. Prospects For Plant Anthelmintics In Tropicalveterinary Medicine. Vet Res Commun 1997; 21(3): 213-228.

45- Cala AC, Chagas ACS, Oliveira MCS, Matos AP, Borges LMF, Sousa LAD, Souza FA, Oliveira GP. In vitro Anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichilia clausenii* C. against sheep gastrointestinal nematodes. Exp Parasitol 2012; 130(2): 98–102.

46- Szewczuk VD, Mongelli ER, Pomilio A B. Antiparasitic activity of *Melia azedarach* growing in Argentina. Molecular Medicinal Chemistry 2003; 1: 54-57.

47- Wandscheer CB, Duque JE, da Silva MAN, Fukuyama Y, Wohlke JL, Adelman J, Fontana JD. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. Toxicon 2004;44(8): 829–835.

48- Maciel MV, Morais SM, Bevilaqua CML, Camurc ALF, Vasconcelos A, Costa CTC, Castro CMS. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol 2006; 98–104.

۴۹- شرافتی چالشتری ر، شرافتی چالشتری ف، رفیعان کوپایی م، اشرفی ک. تعیین میزان ترکیبات

فنلی و اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی مغز گردو. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید

صدوقی یزد. دوره ۱۹، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۰. ۵۲۳-۵۳۲.

50- Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. Food Cosmet Toxicol 2008; 46(6): 2103–2111.

51- Bahmani M, Banihabib E, Saki K, Kazemi-Ghoshji B, Heydari A, Hashemi M. Anti-Leech and Disinfection Activities of Methanolic Extracts of Walnut (*Juglans regia* L.) and Oleander (*Nerium oleander* L.) on *Limnatis nilotica*. World J Zoology 2012; (3): 267-272.

52- Wang YN, Wang HX, Liu YB, Shi GL. Insecticidal Activity of *Juglans regia* Extracts against *Tetranychus cinnabarinus* and Their Effects on Relative Enzymes Activity in *Tetranychus cinnabarinus*. Information Tech and agricultural Eng 2012; 611-620.

۵۳- خلیلی دهکردی ب، رفیعان م، حجازی ح، یوسفی ح ع، یکتائیان ن، شیرانی بیدآبادی ل.
بررسی تاثیر عصاره های گیاهی افسنطین، بومادران و برگ گردو بر انگل تریکوموناس واژینالیس در
محیط کشت آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ویژه نامه طب تکمیلی ۱۳۸۹. دوره
۱۲، شماره ۴: ۶۹-۶۲.

54-Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. Molecules 2012; 17(3): 2542-2566.

55- Tan R X, Zheng W F, Tang HQ. Biologically Active Substances from the Genus *Artemisia*. Planta Medica 1998; 295—302.

۵۶- رستمی م، نهروانیان ح، فرهمند م، ضیایی ه، شریف م، مقصودلو راد ف. تأثیر عصاره ی

متانولی درمنه کوهی (*Artemisia aucheri* Boiss) بر بهبود زخم های پوستی ایجاد شده با

انگل لیشرمانیا مازور در BALB/c. داروهای گیاهی، سال دوم، شماره ۴. زمستان ۱۳۹۰: ۲۶۹ -

۲۷۴.

57- Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P, Chatterjee M. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1213–1218.

58-Caner A, DÖ skaya M, Deg ğirmenci A, Can H, Baykan S, Üner A, Basdemir G, Zeybek U, Gürüz Y. Comparison of the effects of *Artemisia vulgaris* and *Artemisia absinthium* growing in western Anatolia against trichinellosis (*Trichinella spiralis*) in rats. *Exp Parasitol* 2008; 173–179.

59- Edris A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytother Res* 2007; 21: 308–323.

60-Nibret E, Wink M. Volatile components of four Ethiopian *Artemisia* species extracts and their in vitro anti trypanosomal and cytotoxic activities. *Phytomedicine* 2010; 369–374.

61-Pérez SG, Ramos-López MA, Sánchez EM, Fresán-Orozco MC. Antiprotozoa activity of some essential oils. *J Med Plant Res* 2012; 2901-2908.

62- Doroodgar A, Arbabi M, Razavi MR, Mohebbali M, Sadr F. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Murine Model by Hydro Alcoholic Essence of *Artemisia sieberi*. Iranian J Arthropod-Borne Dis 2008; 2(2): 42-47.

63- Conti B, Canale A, Bertoli A, Gozzini F, Pistelli L. Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res 2010; 107: 1455–1461.

۶۴- نائینی ع، ناصری م، کمال نژاد م، خوش زبان ف، رجبیان ط، اسماعیل زاده نامی ح، منصوری ص، زاویه د. بررسی اثرات اسانس ها و عصاره های ۵۰ گیاه دارویی ایران روی سویه ای استاندارد کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه گیاهان دارویی. سال دهم، دوره دوم. شماره مسلسل سی و هشتم. بهار ۱۳۹۰.

۶۵- رنجبریان پ، صادقیان س، شیرازی م ح، صراف نژاد ع، فاضلی م ر، امین غ، مجلسی ا، مانی کاشانی خ، کورکی م. مطالعه اثر ضدباکتریایی ۴ عصاره گیاهی دارچین، زیره سیاه، رازیانه و شوید بر روی هلیکوباکتریلوری به روش دیسک دیفیوژن و فلوسیتومتری. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان. سال یازدهم، شماره ۳. پائیز ۱۳۸۳.

۶۶ - حجازی ح، شیرانی بیدآبادی ل، ذوالفقاری باغبادرانی آ، صابری ص، نیلفروش زاده م ع، مرادی ش، محمودی م، خسروی ش، عطایی آ. مقایسه اثربخشی عصاره های هیدروالکلی گیاهان آویشن شیرازی، بومادران، حنا و سیر بر (BALB/c) ضایعات جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور در مدل حیوانی. فصلنامه گیاهان دارویی. سال هشتم. دوره دوم. شماره مسلسل سی ام. بهار ۱۳۸۸.

۶۷- ایزدی ج، شریف م، خلیلیان ع، ضیایی ه، آزادبخت م، عادل س. بررسی اثرات ضد کرم گیاه بومادران (*Achillea Milleflium*) بر روی انگل اکسیوردرموش. مجله علمی پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران. سیزدهم. شماره ۴۰. پاییز ۱۳۸۲.

68- Macedoa ITF, Bevilaquaa CML, de Oliveiraa LMB, Camurc ALF, Vasconcelosb A, Vieirac LdS, Oliveiraa FR, Queiroz-Juniora E M, Toméa A da R, Nascimento NRF. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 2010; 93-98.

۶۹- رنجبر بهادری ش، آذرهوش ف. مطالعات ترکیبات گیاهی (دارچین، نعناع و اکالیپتوس) موثر در کنترل جرب قرمز طیور (درمانیسوس گالینه). مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۸، شماره ۳. ۱۳۹۲: ۲۰۸-۲۰۳.

۷۰- صفرنژاد تمشکل ف، خاتمی نژاد م ر، نصرالهی عمران آ، راهداری پ، غلامحسین پور ف، کاظمی افرمجانی س، راه نورد آ. تاثیر عصاره متانولی اکالیپتوس و مرزه و گلپر بر روی کیست ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی. مجله علوم آزمایشگاهی. دوره ششم (شماره ۲) پاییز و زمستان ۱۳۹۰: ۷۱- تقی زاده م، جاروندی ص، یاسا ن. مروری بر گیاه اکیناسه آ. شماره چهارم. پاییز ۱۳۸۱: صفحه ۱۳-۲۵.

72- Taghizadeh-Jahed M , Jarolmasjed SH, Mohamadnejad S, Rezaii A , Delazar A: a morphometric & histopathologic study. *Tehran Univ Med J* 2008; 66 (9) :625-632.

73- Canlas J, Hudson JB, Sharma M, Nandan D. Echinacea and trypanosomatid parasite interactions: Growth-inhibitory and anti-inflammatory effects of Echinacea. *Pharm Biol* 2010; 48(9):1047-1052.

74- Spooler HAM, Mejer HE, Vermeer HM, Meerburg BG, Van Krimpen M, Kijlstra HA. Prevention and treatment of parasitic infections in organic pigs. 3rd QLIF Congress, Hohenheim, Germany. 2007; 720-23.

75- Orengo J, Buend A J, Ruiz-Ibanez MR, Madrida J, Del Roc L, Catal-Gregoria P, Garc V, Hernandez F. Evaluating the efficacy of cinnamaldehyde and Echinacea purpurea plant extract in broilers against *Eimeria acervulina*. *Vete Parasitol* 2012; 158– 163.

76- Soudi S, Hashemi SM, Zavarani Hosseini A, Ghaemi A, Asghari Jafarabadi M. Antileishmanial Effect of Echinacea purpurea Root Extract Cultivated in Iran. *Iranian J of Pharma Research* 2007; 6 (2): 147-149.

۷۷- نورالهی ز. بررسی اثر آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس دارچین و عصاره سرخارگل بر

نگهداری کلمپه. کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی. دانشگاه تربیت مدرس تهران. بهمن ۱۳۸۹.

78-Bao X, Yuan H, Wang C, Liu JL. Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi*. *Carbohydr Polym* (2013); 1236– 1243.

79-Attard E, Cuschieri A. In vitro immunomodulatory activity of various extracts of Maltese plants from the Asteraceae family. *J Med Plant Res* 2009; 3(6): 457-461.

80-Kim HT, Ku SK, Kim J W, Jin TW, Lim MK, Kim JE, Do YJ, Yeo SG, Jang KH, Oh TH, Lee KW. Remove from marked Records Effects of *Artemisia capillaris* methanol extract on CD3+, CD4+, CD8+ and TNF- α + splenic cells in tumor cells inoculated mice. *Journal of Veterinary Clinics* 2009; 26 (1): 1-7.

81- Sharififar F, Pournourmohammadi S, Arabnejad M, Rastegarianzadeh R, Ranjbaran O, Purhemmaty A. Immunomodulatory Activity of Aqueous Extract of *Heracleum persicum* Desf. in Mice. *Iran J Pharm Res* 2009; 8(4): 287-292.

82-Karimi M H, Ebadi P, Amirghofran Z. Parsley and immunomodulation. *Expert Rev Clin Immunol* 2012; 8(4): 295–297.

83- Jonsdottira G, Omarsdottird S, Vikingssona A, Hardardottirc I, Freysdottir J. Aqueous extracts from *Menyanthes trifoliata* and *Achillea millefolium* affect maturation of human dendritic cells and their activation of allogeneic CD4+ T cells in vitro. *J Ethnopharmacol* 2011; 88–93.

84- Yoshimura M, Akiyama H, Kondo K, Sakata K, Matsuoka H, Yoshiaki A, Teshima R, Yoshida T. Immunological Effects of Oenothien B, an Ellagitannin Dimer, on Dendritic Cells. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 46-56.

85 - Benson J M, Pokorny A J, Rhule A. Wenner CA, Vamsikrishna K, Cech N B, Shepherd DM. *Echinacea purpurea* extracts modulate murine dendritic cell fate and function. *Food Chem Toxicol* 2010; 1170–1177.

- 86- Wang C Y, Chiao M T, Yen PJ, Huang W C, Hou CC, Chien S C, Yeh KC, Yang WC , Shyur L F, Yang N S. Modulatory effects of Echinacea purpurea extracts on human dendritic cells: A cell- and gene-based study. *Genomics* 2006; 801–808.
- 87- Burger R A, Torres AR, Warren RP, Caldwell V D, Hughes B G. Echinacea-Induced Cytokine Production By Human Macrophages. *Int J Immunopharmac*. 1997; 19(7): 371- 379.
- 88- Tariku Y, Hymete A, Hailu A, Rohloff J. In vitro evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of artemisia absinthium and echinops kkebericho. *Chemistry&Biodiversity* Chem Biodivers. 2011; 8(4): 614 - 623.
- 89- Tariku Y, Hymete A, Hailu A, Rohloff J. In vitro evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of artemisia absinthium and echinops kkebericho. *Chemistry&Biodiversity* Chem Biodivers. 2011; 8(4): 614 - 623.
- 90- Dalimi A, Motamedi Gh, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z, Ghaffari Far F. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. *Vet Parasitol* 2002; 105:161-171.
- 91- Smyth JD, Barrett NJ. Procedure for testing the viability of human hydatid cysts following surgical removal, specially after chemotherapy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980; 74: 649–652.

